



Diseño y construcción de un equipo para extracción con fluidos supercríticos (EFS) en flujo continuo, a nivel de laboratorio, destinado a la obtención de extractos con actividad antioxidante procedentes de residuos agroindustriales

JOSÉ ALEJANDRO BOURDON GARCÍA
Químico U.N.

Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Maestría en Ciencias Químicas
Bogotá D.C., Colombia

2017

Diseño y construcción de un equipo para extracción con fluidos supercríticos (EFS) en flujo continuo, a nivel de laboratorio, destinado a la obtención de extractos con actividad antioxidante procedentes de residuos agroindustriales

JOSÉ ALEJANDRO BOURDON GARCÍA
Químico U.N.

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Químicas

Director:
Químico, Ph.D. Fabián Parada Alfonso

Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Maestría en Ciencias Químicas
Bogotá D.C., Colombia
2017

A mi familia, especialmente a mis hijos Tiffany, Paula y Filiph por la fuerza que han generado en mí para continuar avanzando en mi estudio.

A mis padres ya que ven en mi la realización de toda una vida de sueños y esfuerzos.

Especial dedicatoria a mi hermano Ruben Bourdon, puesto que ha sido quien en el ámbito académico y profesional ha puesto en mí su confianza y me ha dado su apoyo incondicional, con su ejemplo de persistencia y tenacidad.

Agradecimientos

Al profesor Fabián Parada por su apoyo, consejos y acertada orientación dentro de todo mi quehacer académico y personal, gran docente y persona que me dio el privilegio de pertenecer a su grupo de investigación.

Al proyecto de investigación “Evaluación de tecnología innovadoras para el manejo integral de los cultivos de mango, naranja y mandarina en zonas productoras del Departamento de Cundinamarca” por el apoyo económico brindado y facilitar muestras de trabajo.

A la Universidad Nacional de Colombia y todos los integrantes del grupo de investigación “*Estudio de los cambios químicos y bioquímicos de alimentos frescos y procesados*” de la Universidad Nacional de Colombia por su colaboración en cada uno de los pasos dados para este logro académico.

Un gran abrazo a los profesores del Departamento de Química de la Universidad Nacional, por sus orientaciones y enseñanzas en general.

Resumen

El objetivo principal de este trabajo es presentar el diseño y la construcción de un aparato versátil para realizar extracciones a alta presión, que permite obtener extractos usando fluidos supercríticos (extracción con fluidos supercríticos-EFS), y puede operar en flujo continuo (EFSFC) o discontinuo (EFS), con la posibilidad de controlar la cantidad de modificador de polaridad (EFS con modificador). El equipo construido se empleó para obtener extractos desde diferentes biomásas vegetales (hojas de orégano-HO, *Lippia origanoides*; semillas de guayaba-SG, *Psidium guajava* L.; semillas de papaya-SP, *Carica papaya*; y epicarpio de mandarina-EM, *Citrus reticulata*), teniendo como disolvente dióxido de carbono (CO_2) y en algunos casos etanol (EtOH) como modificador. Los métodos de extracción utilizados fueron: EFS, EFS con modificador (EFS-EtOH), EFSFC y EFSFC con modificador (EFSFC-EtOH). Además se obtuvieron extractos por técnicas clásicas como son arrastre con vapor y Soxhlet. A todos los extractos obtenidos se les determinó (i) el rendimiento en base seca y (ii) la actividad antioxidante (A.A.) se evaluó en HO, SG y SP, mediante los métodos *in vitro* del radical DPPH y del blanqueamiento de β -caroteno. Los extractos obtenidos de EM fueron analizados por la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés).

Los mejores rendimientos obtenidos, para cada biomasa, fueron HO 17,68% (mediante EFSFC-EtOH 7%, 150 bar, 40 °C, 50 min. y 25 $\text{g}_{\text{CO}_2}/(\text{h} \cdot \text{g}_{\text{muestra}})$), SG 17,28% (EFS-EtOH 10%, 200 bar, 50 °C y 240 min.), SP 23,59% (EFSFC-EtOH 8%, 200 bar, 50 °C, 420 min. y 25 $\text{g}_{\text{CO}_2}/(\text{h} \cdot \text{g}_{\text{muestra}})$) y EM 1,91% (EFSFC-EtOH 10%, 300 bar, 35 °C y 20 min.). Para dichos extractos el método del radical DPPH permitió determinar que las biomásas HO, SG y SP presentaron 1,28, 2,24 y 3,38 equivalentes milimolar de Trolox, respectivamente. Por otra parte, la actividad antioxidante por blanqueamiento del β -caroteno, para los respectivos extractos, dio como resultado, en porcentaje de inhibición de la decoloración, HO 24,27 %, SG 69,43 % y SP 63,03 %. El análisis por CG-EM de los extractos obtenidos del EM permitió evidenciar que el componente mayoritario es el limoneno, encontrando que este disminuye al usar EtOH como modificador.

Finalmente se encontró que el aparato construido permite obtener resultados comparables y de igual magnitud a los reportados por otros autores

Palabras clave: extracción con fluidos supercríticos, fluidos supercríticos con modificador, hojas de orégano, semillas de guayaba, semillas de papaya, epicarpio de mandarina, actividad antioxidante.

Abstract

The main objective of this work is to present the design and construction of a versatile apparatus for extracting at high pressure, which allows extractions using supercritical fluids (supercritical fluid extraction-EFS), and can operate in continuous flow (EFSFC) or discontinuous flow (EFS), with the possibility of controlling the amount of polarity modifier (EFS or EFSFC with modifier). The equipment was used to obtain extracts from different vegetable biomass (Oregano leaves-HO, Lippia organoides, guava seeds-SG, Psidium guajava L., papaya seeds-SP, Carica papaya, and mandarin epicarp-EM, Citrus reticulata), having as solvent carbon dioxide (CO_2) and in some cases ethanol (EtOH) as a modifier. The extraction methods used were: EFS, EFS with modifier (EFS-EtOH), EFSFC and EFSFC with modifier (EFSFC-EtOH). In EM also were obtained by classical techniques such as steam drag (AV) and Soxhlet (SH). All extracts obtained were: (i) dry basis yield and (ii) antioxidant activity (A.A.) was evaluated in HO, SG and SP by in vitro methods of the DPPH radical and β -carotene bleaching. The extracts obtained from EM were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

The best yields obtained for each biomass were HO 17.68% (EFSFC-EtOH 7%, 150 bar, 40 ° C, 50 min and 25 g CO_2 / (h * g_{sample})), SG 17.28% (EFS-EtOH 10%, 200 bar, 50 ° C and 240 min.), SP 23.59% (EFSFC-EtOH 8%, 200 bar, 50 ° C, 420 min and 25 g CO_2 / (h * g_{sample})) and 1.91% EM (10% EFSFC-EtOH, 300 bar, 35 ° C and 20 min.). For these extracts the DPPH radical method allowed to determine that the biomasses HO, SG and SP presented 1,28, 2,24 and 3,38 millimolar equivalents of Trolox, respectively. On the other hand, the antioxidant activity by bleaching of β -carotene, for the respective extracts, resulted, in percentage of inhibition of the discoloration, HO 24.27%, SG 69.43% and SP 63.03%. The GC-MS analysis of the extracts obtained from the EM allowed to show that the major component is limonene, finding that this decreases when using EtOH as modifier.

Finally, it was found that the constructed apparatus allows obtaining comparable results and of equal magnitude to those reported by other authors

Key words: extraction with supercritical fluids, supercritical fluids with modifier, oregano leaves, guava seeds, papaya seeds, mandarin epicarp, antioxidant activity.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XVI
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVII
Introducción	1
1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
1.1 Justificación	3
1.2 Objetivos.....	5
1.2.1 Objetivo general	5
1.2.2 Objetivos específicos	5
1.3 Hipótesis.....	5
2 MARCO TEÓRICO	6
2.1 Pretratamientos de las muestras	6
2.2 Técnicas de extracción	6
2.2.1 Técnicas clásicas	7
2.2.2 Técnicas emergentes de extracción	9
2.3 Fluidos supercríticos	10
2.3.1 Definición de fluidos supercríticos (FS)	10
2.3.2 Ventajas de la extracción con fluidos supercríticos (EFS)	12
2.3.3 Variables de trabajo	12
2.3.4 Propiedades de fluidos supercríticos comunes.....	16
2.3.5 Sistemas de extracción discontinuos y de flujo continuo.	18
2.3.6 Esquema básico de un equipo para EFS	19
2.3.7 Partes del equipo	20
2.3.8 Rendimiento y calidad de los extractos	30
2.3.9 Muestras de trabajo	36
3 METODOLOGÍA	39
3.1 Diseño y construcción de equipo para EFS	40
3.1.1 Reservorio de disolvente y modificador	40
3.1.2 Tubing y uniones.....	41
3.1.3 Sistema propulsor del disolvente.....	41
3.1.4 Sistema propulsor del modificador	42
3.1.5 Cámara de extracción	43

3.1.6	Flujo dentro de la cámara de extracción	44
3.1.7	Entrada y salida de la cámara de extracción.....	45
3.1.8	Sellado de la cámara de extracción	46
3.1.9	Terminado superficial de la cámara de extracción	46
3.1.10	Agitación en la cámara de extracción	46
3.1.11	Mezclador de disolvente y modificador	46
3.1.12	Calentamiento.....	47
3.1.13	Válvulas	47
3.1.14	Válvulas cheque	47
3.1.15	Sistema colector de extracto.....	49
3.1.16	Medidor de flujo	49
3.1.17	Limpieza y calibración del equipo	50
3.2	Obtención de extractos a partir de matrices vegetales	51
3.2.1	Preparación de muestra.....	51
3.2.1.3.	Epicarpio de mandarina	52
3.2.2	Métodos usados para EFS.....	53
3.2.3	Evaluación del rendimiento y la calidad de los extractos.....	54
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
4.1	Diseño y construcción del equipo para EFS	58
4.2	Rendimiento y calidad de los extractos obtenidos.	59
4.2.1	Rendimiento de los extractos obtenidos.....	60
4.2.2	Calidad de los extractos obtenidos	61
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
5.1	Conclusiones.....	67
5.2	Recomendaciones.....	67
	Anexo A: ANOVA, para análisis de datos de rendimiento HO, SG y SP	69
	Anexo B: ANOVA, para análisis de datos de calidad HO, SG y SP	70
	Anexo C: Curva de calibración para la A.A. por radical DPPH	71
	Anexo D: Curva de calibración para el blanqueamiento del β-caroteno	72
	Bibliografía	73

Lista de figuras

Figura No.1 Sistema de extracción Soxhlet.

Figura No.2 Ejemplo de un diagrama de fases para una sustancia pura.

Figura No.3 Promedio anual (1998-2016) de publicaciones con la temática “supercritical fluid” (SF) en la base de datos Science Direct.

Figura No.4 Relación entre la presión reducida ($Pr = P/P_c$), y la densidad deducida ($rr = r/r_c$) para CO₂ a diferentes temperaturas.

Figura No.5 Relación para el dióxido de carbono (CO₂) entre la presión y dos variables: la constante dieléctrica y la densidad

Figura No.6 (a) Relación entre la capacidad disolvente del CO₂ y la presión. (b) Relación entre la capacidad disolvente y la densidad reducida para distintos disolventes.

Figura No.7 Relación entre difusividad y temperatura para el CO₂ a diferentes presiones

Figura No.8 Relación de la viscosidad a medida que cambia la presión, para tres diferentes temperaturas

Figura No.9 Esquema de clasificación para métodos de extracción.

Figura No.10. Cambio en la concentración final de un analito dentro del líquido de partida al variar el número de porciones en la que se divide el líquido extractante.

Figura No.11 Esquema general para un equipo de extracción con fluidos supercríticos (EFS)

Figura No.12. Esquema de una cámara de extracción clásica usada en EFS

Figura No.13. Perfiles de concentración en la interface a diferentes tiempos considerando iguales coeficiente de difusión en dos fases inmiscibles.

Figura No.14 Porcentaje de recuperación para metoxicloro y pireno con el cambio de la relación diámetro a volumen

Figura No.15 Cambio en la resistencia a la fatiga de un material con base en la terminación superficial recibida.

Figura No.16. Formas de restrictores.

Figura No.17 Estructuras para (a) el fenol y (b) anisol

Figura No.18 Diagrama de mecanismo para la peroxidación de dienos conjugados

Figura No.19. Estructura del radical DPPH

Figura No.20 Estructura del complejo tripiriditriazina (TPZ) de hierro

Figura No.21 Estructura de b-caroteno

Figura No.22. Estructura del azo-iniciador clorhidrato de 2,2'-azobis(amidinopropano).

Figura No.23. Esquema del equipo construido para EFS en flujo continuo

Figura No.24 Bomba de membrana metálica con doble cheque e impulsión por medio de aceite hidráulico

Figura No.25 Corte lateral de orificio de inspección para bomba de membrana metálica

Figura No.26 Bomba de pistones recíprocantes usada para suministrar modificador (EtOH)

Figura No.27 Cámara de extracción usada en el equipo construido para EFS.

Figura No.28 Modelamiento de los cambios en el flujo dentro del reactor por cambios en la entrada y salida del reactor.

Figura No.29 Dirección de flujo en la cámara de extracción

Figura No.30. Mezclador de disolvente y modificador de polaridad

Figura No.31 Válvula cheque en acero para alta presión.

Figura No.32 Válvula on-off para alta presión

Figura No.33 Válvula de seguridad para alta presión con resorte.

Figura No.34 Válvula de regulación de presión anterior (BPR)

Figura No.35 Separador de extracto y CO₂

Figura No.36 Rotámetro para de CO₂

Figura No.37. Esquema del By Pass en el equipo.

Figura No.38. Procedimiento para extracción de las hojas de orégano-HO (Lipia Origanoide) mediante EFS.

Figura No.39 Procedimiento para obtener extractos de las semillas de guayaba (*Psidium guajava*) SG, y semillas de papaya (*Carica papaya*) SP con EFS.

Figura No.40. Procedimiento para obtener extractos de epicarpio de mandarina-EM (*Citrus reticulata*).

Figura No.41. Zona de trabajo (Presión y Temperatura), para el aparato construido.

Figura No.42 Rendimiento en extracto a partir de las biomásas tratadas.

Figura No.43 Actividad antioxidante (A.A.) de los extractos de HO, SG y SP.

Figura No.44. Patrones de rompimiento para espectrometría de masas de los picos asignados al limoneno.

Lista de tablas

Tabla No.1 Técnicas de extracción clásicas y emergentes.

Tabla No.2 Condiciones críticas de temperatura y presión, para algunas sustancias que pueden ser usadas como disolventes en extracción con fluidos supercríticos (EFS)

Tabla No.3 Momentos dipolares para algunos disolventes usados en EFS.

Tabla No.4 Familias de compuestos con A.A.

Tabla No.5 Resistencias del sistema de calentamiento para el aparato de EFSFC

Tabla No.6. Condiciones de presión, temperatura, tiempo y cantidad de modificador, para la EFS con CO₂ en las matrices de HO, SG, SP y EM.

Tabla No.7. Rendimiento de los ensayos preliminares (AV y SH) para epicarpio de mandarina var.común y var.clementina.

Tabla No.8 Comparación de rendimientos.

Tabla No.9. Resultados de actividad antioxidante (A.A.) para extractos de HO, SG y SP.

Tabla No.10. Índices de Kovats (IK) experimentales para el pico de limoneno.

Tabla No.11. Área para los picos de limoneno en extractos epicarpio var. clementina.

Lista de Símbolos y abreviaturas

% AA	Porcentaje de actividad antioxidante
(-OH)	Grupo hidroxilo
°C	Grados Celsius
A.A.	Actividad antioxidante
Abs	Absorbancia
A _c	Área corregida.
AE	Aceite esencial
ANOVA	Análisis de varianza
Atm	Presión en atmosferas
bar	Presión en bares
BET	Blanqueamiento de β-caroteno
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	3,4-di-t-butil-4-hidroxitulueno
BM	Banco Mundial
By pass	Paso corto del equipo, desvío
CO ₂	Dióxido de carbono
Colciencias	Instituto colombiano de ciencia y tecnología
cps	Centipoises
CTF	Contenido total de fenoles
DPPH	2-2-difenil-1-picrilhidrazilo
EAM	Extracción asistida por microondas
EAS	Extracción asistida por disolventes
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
EFS	Extracción con fluidos supercríticos
EFS-EtOH	Extracción con CO ₂ supercrítico y con modificador de polaridad, etanol
EFSFC	Extracción con CO ₂ supercrítico en Flujo continuo
EFSFC-EtOH	Extracción con CO ₂ supercrítico en flujo continuo con modificador de polaridad, etanol
ENA	Encuesta Nacional Agropecuaria
Eq	Equivalente
ET	Equivalente Trolox
FRAP	Poder antioxidante de reducción férrica
FS	Fluido supercrítico
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a

	espectrometría de masas.
H	Hora
HAT	Método por transferencia de hidrógenos
HD	Hidrodestilación
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
IR	Infra rojo
Kg	Kilogramo
MEFS	Micro extracción en fase sólida
Min	Minuto
mL	Mililitros
μL	Microlitros
MPa	Megapascuales
M.Sc.	Maestría en ciencias
NPT	Roscado según norma americana para tubos
ORAC	Capacidad de absorbancia del radical oxígeno
P _c	Presión crítica
Ph.D.	Doctor en filosofía
P _r	Presión reducida
Psi	Libras fuerza por pulgada cuadrada
PTFE	Politetrafluoro etileno
δ	Densidad
ρ _c	Densidad crítica
ρ _r	Densidad reducida
S	Segundo
SET	Método de transferencia electrónica única
S-L	Extracción sólido-líquido
TEAC	Equivalente Trolox de capacidad antioxidante
TBHQ	Terbutil-hidroxiquinona
T _c	Temperatura crítica
T _r	Temperatura reducida
Trolox	ácido 6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
U.N.	Universidad Nacional de Colombia
UV-vis	Ultravioleta-visible

Introducción

Los países que generan productos con alto valor agregado presentan mejores indicadores socioeconómicos que aquellos que producen materias primas [1]. El diseño y la construcción de los aparatos y equipos necesarios para obtener productos de alto valor agregado son escalones para dominar los procesos productivos. Los aparatos e instrumentos fabricados de acuerdo con las necesidades propias, eliminan las condiciones impuestas por los grandes fabricantes, como por ejemplo la pérdida de garantía, el desabastecimiento de repuestos y la negación del servicio técnico.

En Colombia, la sinergia entre la industria y la academia, se plantea como objetivo de Investigación, Desarrollo e Innovación (ID+i), lo cual se ve plasmado en los principios del modelo de medición para grupos de investigación; que fue promulgado a mitad del 2017 por Colciencias¹. Esta sinergia debe nacer en alguna de las partes involucradas, y en el caso de los aparatos para investigación, es la academia la llamada a iniciar el proceso, con la búsqueda de soluciones acordes a las necesidades investigativas del país. El alto costo de algunos equipos de laboratorio limita la investigación y excluye de ésta labor a los grupos que no disponen de suficientes recursos económicos.

Bajo este panorama, la forma de mejorar las posibilidades de investigación es mediante la generación de aparatos e instrumentos propios, afianzando los conocimientos adquiridos y permitiendo enfocar el trabajo sobre las necesidades intrínsecas, lo que se refleja en la reducción de costos de investigación, e igualmente permite adaptar los equipos según las necesidades particulares, quedando como valores adicionales la ganancia de destreza y la comprensión, tanto en el funcionamiento como en la fabricación de los equipos. Para mejorar lo anteriormente expuesto se hace necesario el desarrollo de las técnicas, metodologías y habilidades que constituyen el “saber como” (*know how*), que es la base para generar un alto valor agregado en las cadenas productivas.

Dentro los grupos de investigación en Colombia, el segundo lugar, en número, es ocupado por la gran área del conocimiento en Ciencias Exactas y Naturales, solo superado por Ciencias Sociales y Humanas¹. Parte de los grupos inicialmente nombrados se dedican al estudio de materiales de origen natural, teniendo la necesidad de obtener extractos a partir de matrices líquidas o sólidas mediante el uso de distintos aparatos. Con el fin de hacer las extracciones, existe la posibilidad de realizarlo mediante el uso técnicas tradicionales o modernas, ubicando dentro de estas últimas la extracción con fluidos supercríticos (EFS).

¹ Colciencias. <http://www.colciencias.gov.co> Recuperado el 10-03-2017

En el sentido de generar equipos propios acordes a las necesidades de cada investigación, el grupo de investigación “*Estudio de los cambios químicos y bioquímicos de alimentos frescos y procesados*” de la Universidad Nacional de Colombia, es uno de los grupos que ya han realizado trabajos al respecto, obteniendo los avales internacionales necesarios para realizar publicaciones técnicas referentes a la fabricación de equipos para la EFS [2].

El mencionado grupo de investigación ha venido trabajando con equipos de alta presión ensamblados por los propios investigadores. Los instrumentos han sido concebidos para desempeñarse en modo discontinuo, un régimen de trabajo también conocido como: cochadas, por lotes, batch o estático, y los aparatos han sido aplicados, en la mayoría de casos, para obtener extractos a partir de productos colombianos de origen silvestre, como orégano (*Lippia organoides*), o también desde residuos agroindustriales como: semillas de guayaba (*Psidium guajava*), semillas de papaya (*Carica papaya*), entre otros. Hay que hacer notar que los beneficios en las cadenas productivas, son mayores cuando se utilizan materiales que comúnmente son descartados dentro de los procesos.

Con el fin de explorar nuevas alternativas y aumentar las posibilidades y perspectivas, en el presente trabajo se construyó un equipo de extracción con fluidos presurizados que permite trabajar en régimen de flujo continuo de disolvente. A los extractos obtenidos se les determinó el rendimiento y la calidad, para comparar contra otros autores, bajo iguales condiciones de trabajo en las mismas matrices. Las matrices vegetales empleadas fueron: hojas de orégano-HO (*Lippia organoides*), semillas de guayaba-SG (*Psidium guajava*), semillas de papaya-SP (*Carica papaya*) y epicarpio de mandarina-EM (*Citrus reticulata*), usando dióxido de carbono (CO₂) como disolvente, aplicando cuatro distintos métodos. Los métodos se presentan en siguiente orden: extracción con CO₂ supercrítico en modo discontinuo (EFS), extracción con CO₂ supercrítico en modo discontinuo con etanol como modificador de polaridad (EFS-EtOH), extracción con CO₂ supercrítico en flujo continuo (EFSFC) y extracción con CO₂ supercrítico en flujo continuo con etanol como modificador (EFSFC-EtOH).

Con la realización de este equipo se concreta y corrobora la posibilidad de aprovechar los recursos existentes, para mejorar las posibilidades de investigación. Se aumentó la capacidad y experiencia en cuanto al dominio, la creación y la construcción de los aparatos para investigación, con lo que se pudo retirar, en parte, la dependencia nacional que hemos tenido hasta el momento, en esta clase de aparatos.

1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Justificación

Se debe reducir la brecha técnica y tecnológica, entre los países desarrollados y los subdesarrollados, brecha que tiende a aumentar cada vez más, sin que los últimos se percaten debido a que se les entregan aparatos listos para su uso, bajo la apariencia de “transferencia de tecnología”, sin permitir el desarrollo de las capacidades para poner a punto sus propios equipos.

Dentro de los equipos importados se encuentran aquellos destinados a labores de investigación, que a veces se han comprado a un precio elevado, bajo prejuicios tales como: (i) solo son confiables los datos provenientes de un equipo comercial, (ii) solo pueden ser fabricados por grandes empresas multinacionales, (iii) la industria nacional no es confiable ni tampoco sus productos y (iv) que no se tiene la capacidad para igualar o mejorar dichos equipos de investigación.

El alto costo de los equipos comerciales para la extracción con fluidos supercríticos (EFS) [2], [3], al igual que sus limitantes para manipularlos, generan la necesidad de diseñar y construir equipos propios, con los recursos y materiales disponibles. Así pues se diseñó y construyó un equipo para extracción con fluidos supercríticos (EFS) que pudiera funcionar en flujo continuo (EFSFC), sin recuperación del CO₂ (ciclo abierto) y con una cámara de extracción de capacidad aproximada de 50 mL. Las condiciones máximas de trabajo fueron: presión 345 bar y temperatura 180°C, lo que permitió el uso de CO₂ supercrítico como disolvente y etanol como modificador de polaridad. Las características del equipo amplían la cantidad de métodos disponibles y la combinación entre los mismos.

Puntualizando un problema dentro de la agroindustria frutícola, cabe decir que comúnmente se procesa solo una parte del fruto, dejando de lado las semillas o el epicarpio, y en algunos casos ambos. En estas partes descartadas del fruto, muchas veces, están contenidas sustancias con actividad biológica de utilidad, como los compuestos que pueden presentar actividades tales como: anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, etc.

Dentro de las aplicaciones de las sustancias con actividad antioxidante está su uso para aumentar el tiempo de vida útil de los alimentos. Al considerar la seguridad alimentaria, se debe contemplar la eficiencia en la conservación y el almacenamiento de los productos alimenticios, que permitan la eficaz reducción de pérdidas originadas por los cambios climáticos, las plagas y otros factores aleatorios. Uno de los puntos que permite a la industria alimentaria aumentar la estabilidad del producto es el uso de aditivos con actividad antioxidante a costo moderado, ya sean de origen natural o sintético. El trabajar

con aditivos naturales, puede no solo ser una ventaja económica sino aún más importante eliminar la utilización de aditivos sintéticos, con reportes perjudiciales para la salud; como es el caso de los antioxidantes sintéticos butilhidroxianisol (BHA) referenciado como inductor de lesiones estomacales [4], butilhidroxitolueno (BHT) nombrado como promotor tumoral a nivel pulmonar [5] y el terbutil hidroxiquinona (TBHQ) reportado como citotóxico y generador de daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) [6].

Con el equipo propio construido en el presente trabajo se usaron como materiales de estudio las hojas de oregano-HO (*Lippia origanoides*) y tres residuos agroindustriales: semillas de guayaba-SG (*Psidium guajava*), semillas de papaya-SP (*Carica papaya*) y epicarpio de mandarina (*Citrus reticulata*), en primer lugar por su abundancia y segundo por tener datos de referencia para comparar y contrastar.

La posibilidad de trabajar en flujo continuo trae ventajas tales como: (i) reducir la fatiga de los materiales, al reducir el número de ciclos de presurización y despresurización al que se ve expuesto el equipo. (ii) La reducción de la cantidad de veces que se realiza el cierre y apertura de válvulas con lo cual aumenta la vida útil de las mismas, especialmente debido a un menor desgaste abrasivo causado por el CO₂, que cuando reduce su temperatura bruscamente, por descompresión, se enfría y pasa a estado sólido. (iii) Extracción exhaustiva de la muestra. (iv) Las piezas destinadas a funcionar en condiciones fluctuantes son más difíciles de dimensionar, que aquellas que funcionan en régimen constante. (v) La modificación de las condiciones de trabajo en un equipo causa más desajuste que cuando se trabaja en circunstancias estables. (vi) Realizar combinaciones de los métodos de flujo discontinuo y flujo continuo. (vii) Cambiar la polaridad de la fase extractante durante el proceso de extracción.

Con un aparato versátil para EFS se abre la perspectiva de realizar cambios en las condiciones de extracción, en variables tales como: presión, temperatura, cantidad de modificador de polaridad y velocidad de flujo, entre otras. Al realizar EFSFC-modificador, usando CO₂ como disolvente, da la opción de hacer un aumento controlado y gradual en la cantidad de modificador de polaridad, permitiendo extraer inicialmente sustancias de polaridad afín al CO₂ (baja polaridad), y separar los analitos de la muestra con base en la afinidad de los mismos por la fase extractante o la matriz. En otras palabras se puede dar una especie de separación “cromatográfica” con gradiente, usando la matriz como la fase estacionaria y la mezcla extractante como la fase móvil, gracias a la capacidad de modificar la constante dieléctrica de la fase móvil por el cambio en la concentración del modificador de polaridad.

El presente trabajo da una herramienta práctica que unifica parcialmente el aspecto investigativo y el técnico, en la elaboración de equipos de laboratorio para realizar extracciones a alta presión, e incentiva a otros investigadores para generar sus propios equipos acordes a las necesidades, aumentando la autonomía y reduciendo costos dentro de las investigaciones.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Diseñar y construir un equipo para extracción con fluidos supercríticos (EFS) funcional, para trabajo en flujo discontinuo y continuo.

1.2.2 Objetivos específicos

Ensamblar un equipo que permita la extracción con fluidos supercríticos, trabajando en flujo discontinuo (EFS) o continuo (EFSFC), y permita emplear modificador de polaridad, usando las partes disponibles.

Obtener extractos, con el aparato construido, a partir de algunas muestras vegetales ya estudiadas, para realizar la comparación del rendimiento y la calidad.

1.3 Hipótesis

Es posible diseñar y construir un equipo para extracción con fluidos supercríticos a nivel de laboratorio, destinado a obtener extractos de origen vegetal, con el valor agregado de: (i) tener mayor dominio en su manejo, (ii) conocer el funcionamiento, (iii) aplicarle los cambios necesarios, y (iv) adaptarlo de acuerdo a las necesidades particulares, así como utilizarlo en la búsqueda del aprovechamiento integral de algunos materiales vegetales colombianos, mediante un proceso de extracción amigable con el medio ambiente. El rendimiento se asemeja a lo reportado, cuando se trabaja sobre las biomásas HO, SG, SP y EM. La calidad de los extractos (HO, SG y SP), evaluada con A.A. por los métodos *in vitro* del radical DPPH y blanqueamiento de β -caroteno, es comparable a la referenciada para extractos obtenidos con otros equipos, en iguales condiciones. Para los extractos de EM se puede identificar el limoneno para evaluar la calidad de los extractos obtenidos por técnicas clásicas y la técnica emergente, extracción con fluidos supercríticos.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Pretratamientos de las muestras

Los pretratamientos permiten acondicionar la muestra antes de iniciar el proceso de extracción, éstos pueden afectar los resultados obtenidos debido a las condiciones a las que se somete la muestra (temperatura, flujo de aire, luz, etc.). En la mayoría de los pretratamientos se pretende aumentar el acceso del agente disolvente hacia la muestra, tal es el caso de un fuerte pulso eléctrico, con lo que se logra romper la membrana celular [7]. Por su parte, los agentes tensoactivos son otra forma de romper la membrana y mejorar la proximidad entre solutos y disolvente [8]. Igualmente, las enzimas pueden usarse para mejorar la accesibilidad a los analitos de interés [9]. El ultrasonido ha sido usado para el mismo fin, antes [10], durante [7] o después del proceso extractivo [11], con frecuencias que oscilan entre 20 y 100 MHz. Finalmente, algunos autores sugieren la adición de sustancias antioxidantes cuando se desean obtener extractos con esta actividad biológica [8].

2.2 Técnicas de extracción

El proceso de extracción se contempla como la separación selectiva de una mezcla de sustancias. En la tabla No.1 se enuncian algunas técnicas de extracción, clasificándolas como clásicas o emergentes. Por definición las mezclas pueden ser separadas en fracciones con base en las diferencias de las propiedades físicas. Gran parte de las separaciones están contempladas dentro de las llamadas operaciones unitarias. Las propiedades físicas en las que se basa, comúnmente, la separación de mezclas son: presión de vapor, solubilidad, densidad, tamaño de partícula, temperatura de ebullición, temperatura de fusión, afinidad química, comportamiento en campos magnéticos, entre otras. En los inicios de las técnicas extractivas los extractos obtenidos a partir de matrices vegetales se orientaron a objetivos alimentarios y medicinales.

Algunos autores [12] clasifican la extracción en tres categorías: (i) discontinuo, por lotes, batch o estático, cuando no fluye el disolvente ni la muestra. (ii) Cuando el flujo de disolvente es continuo este puede clasificarse como dinámico o semicontinuo. (iii) El término continuo se reserva para los casos en donde hay flujo permanente de muestra y disolvente

Tabla No.1 Técnicas de extracción clásicas y emergentes.

TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN	
Clásicas	Emergentes
Prensado	Micro extracción en fase sólida (MEFS)
Cristalización o precipitación	Extracción asistida por microondas (EAM)
Destilación	Extracción acelerada con disolventes (EAD)
Arrastre con vapor (AV) e hidrodestilación (HD)	Microextracción en fase sólida (MEFS)
Extracción S-L (con disolventes, maceración y lixiviación)	Extracción con fluidos supercríticos (EFS)
Filtración y ultrafiltración	Extracción asistida con pulso eléctrico (ESPE)
Centrifugación	Extracción asistida con ultrasonido (EAU)
Cromatografía	

2.2.1 Técnicas clásicas de extracción

En términos generales las técnicas clásicas de extracción requieren poca destreza, baja tecnología y limitada investigación. En estas técnicas se tiene como desventaja la elevada cantidad de muestra para poder obtener extractos, al igual que el riesgo de degradar parte de material susceptible a las condiciones de extracción, como en el caso del calentamiento.

Una de las primeras formas para extraer sustancias de interés desde matrices sólidas vegetales, en forma industrial, fue la extracción por prensado mecánico, que consiste en la compresión del material, entre dos fuertes piezas sólidas, hasta obtener extractos líquidos, el equipo es fácil de comprender, pues funciona como una prensa mecánica. En la actualidad ésta es la técnica más utilizada para la extracción de aceites vegetales comestibles.

Para el caso de la cristalización, ocurre que al llegar una solución a un estado de sobresaturación, se debe retirar una parte del soluto para retornar al equilibrio, por lo que inicia el proceso de nucleación en lugares donde se ve favorecido el crecimiento, y continua el crecimiento de dichos núcleos hasta convertirse en cristales, los que a su vez precipitan con base en la diferencia de densidades aplicando la ley de Stokes.

Así mismo, es posible separar una mezcla de líquidos por diferencia en los puntos de ebullición mediante la destilación, lo que implica realizar un calentamiento el cual puede conllevar a la descomposición de sustancias termolábiles. Para reducir los daños por calentamiento, se puede realizar una destilación a presión reducida.

Cuando se desean retirar selectivamente los productos volátiles que se encuentran en una matriz sólida, es decir analitos con alta presión de vapor, se recomienda el uso de la técnica conocida como destilación por arrastre con vapor (AV), en donde el espacio de cabeza (*head space*), que se encuentra sobre la matriz y que contiene los analitos de interés, es arrastrado continuamente por una corriente de vapor de agua, posteriormente

ésta mezcla gaseosa se condensa permitiendo que se separe el agua de los productos insolubles en ella.

También para los analitos con alta presión de vapor se puede usar la hidrodestilación (HD), en donde el agua codestila junto con algunas sustancias de la matriz sólida, que luego por condensación se pueden obtener dos fases inmiscibles. En esta técnica de nuevo se corre un alto riesgo de daño por temperatura en las sustancias termolábiles, debido a un elevado tiempo de exposición térmica.

La maceración es un caso de extracción sólido-líquido, en la que la matriz sólida que contiene los analitos se tritura en presencia de un disolvente frío o caliente, terminando con una filtración. Al obtener una fase líquida que contiene los analitos de interés se debe realizar una posterior etapa de separación, para retirar el disolvente. En el caso de la separación que se lleva a cabo con calentamiento, puede ocurrir, como ya se mencionó, la descomposición de sustancias termolábiles.

Otra técnica de extracción convencional consiste en retirar selectivamente desde un sólido una fracción por solubilidad en un disolvente, es de anotar que la matriz sólida debe ser insoluble en el disolvente, para poder separarla. En esta técnica se tiene el inconveniente de separar los analitos de la fase extractante, y en el caso de ser productos para consumo humano, puede ser necesario retirar el disolvente totalmente.

Por último, en esta clase de extracciones (sólido-líquido) se tienen los métodos continuos, donde el más conocido es el equipo de extracción tipo Soxhlet, cuyo montaje se muestra en la figura No.1, en este equipo primero se extrae la fracción soluble en el disolvente caliente, la cual se acumula en la parte inferior del equipo, que sirve como reservorio del disolvente (c), y posteriormente por calentamiento, se evapora el disolvente, el que luego de retornar a estado líquido en el condensador(a) es reutilizado para extraer al caer sobre la muestra contenida en el extractor Soxhlet (b).

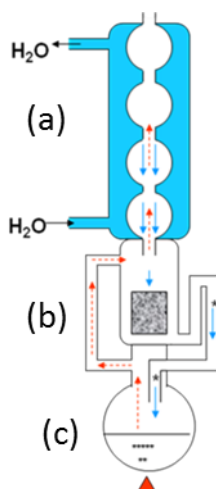


Figura No.1 Sistema de extracción Soxhlet.

Las principales ventajas del método de extracción tipo Soxhlet son: (i) la extracción exhaustiva de los componentes solubles en el disolvente caliente y (ii) el uso de una cantidad limitada de disolvente; como desventajas están: (i) el extracto está sometido a

calentamiento durante el proceso, (ii) la velocidad de extracción es muy lenta, (iii) requiere una cantidad considerable de muestra y (iv) requiere una etapa posterior para retirar el disolvente.

2.2.2 Técnicas emergentes de extracción

Como alternativa a las técnicas anteriormente descritas, actualmente se cuenta con otras formas de extracción tales como la microextracción en fase sólida (MEFS), donde por afinidad de los analitos hacia una fase sólida son adsorbidos y posteriormente se desorben, de acuerdo con el cambio en las condiciones, pero en este caso la cantidad de extracto es limitada, según sea el área superficial del sólido adsorbente. Como ventaja está la posibilidad de concentrar los analitos que se encuentra en un fluido (líquido o gas) o en un sólido. En términos generales las técnicas emergentes tienen como ventaja la necesidad de poca muestra, pero con la desventaja de que algunas son de difícil escalar.

La extracción asistida por microondas (EAM), es una extracción sólido-líquido (S-L) en la cual se ponen en contacto el disolvente y la muestra dentro de un recipiente sometido a las microondas. El efecto de la microondas consiste en transferir la energía en forma puntual, mejorando el rendimiento de los extractos [10].

Otra técnica emergente es la extracción acelerada con disolvente (EAD), la cual consiste en una extracción sólido-líquido amentando la presión en presencia de un disolvente caliente, aprovechando el aumento de la solubilidad con la temperatura y el aumento de la capacidad de solvatación a medida que aumenta la presión, sin superar las condiciones de temperatura y presión críticas del disolvente. Para lo anterior el material es colocado junto con el disolvente dentro de un recipiente que resiste alta presión, con calentamiento y se aumentan los valores para estas dos variables (presión y temperatura) por debajo de los valores críticos.

También al usar extracción asistida por ultrasonido (EAU) se ejerce una acción favorable para la solubilización, al agitar puntualmente el fluido y la matriz de origen, consiguiendo una mayor solubilidad junto con el aumento de la temperatura, que coadyuva para una mejor extracción.

Finalmente se tiene la técnica de interés para el presente trabajo, que es la extracción con fluidos supercríticos (EFS), donde las condiciones del disolvente superan la temperatura y presión crítica.

2.3 Fluidos supercríticos

2.3.1 Definición de fluidos supercríticos (FS)

Se define como fluido supercrítico al estado de agregación en el que se supera la presión crítica (P_c) y la temperatura crítica (T_c) para una sustancia. En el diagrama de fases que se muestra en la figura No.2, el equilibrio entre las fases líquida y gaseosa se extiende desde el punto triple hasta el punto crítico. Por encima de las condiciones de P_c y T_c se encuentra la zona supercrítica para una sustancia, donde se presentan propiedades mixtas entre líquido y gas. Dentro de las propiedades intermedias están: la constante dieléctrica, la difusividad, la densidad y la viscosidad. El interés para trabajar con fluidos supercríticos se basa en la alta difusividad, baja viscosidad, gran capacidad de solvatación, baja temperatura de extracción y alta selectividad. La selectividad está regida por la relación entre la presión y la temperatura de trabajo, por lo que son variables de trabajo determinantes en el extracto obtenido.

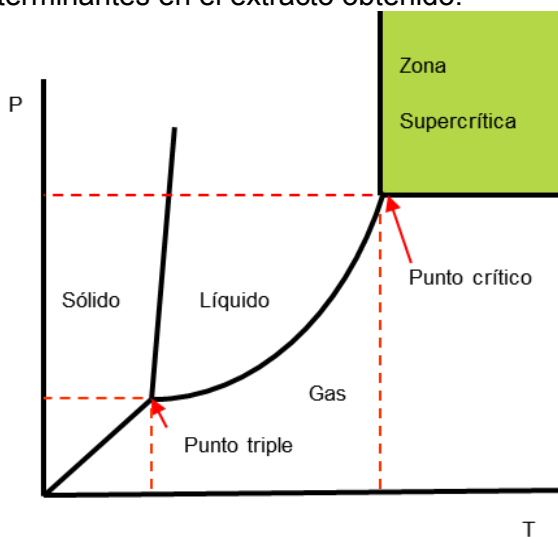


Figura No.2 Ejemplo de un diagrama de fases para una sustancia pura.

El interés hacia los fluidos supercríticos se ve reflejado en la cantidad de publicaciones que se realizan sobre el tema en revistas internacionales, como se muestra en la figura No.3.

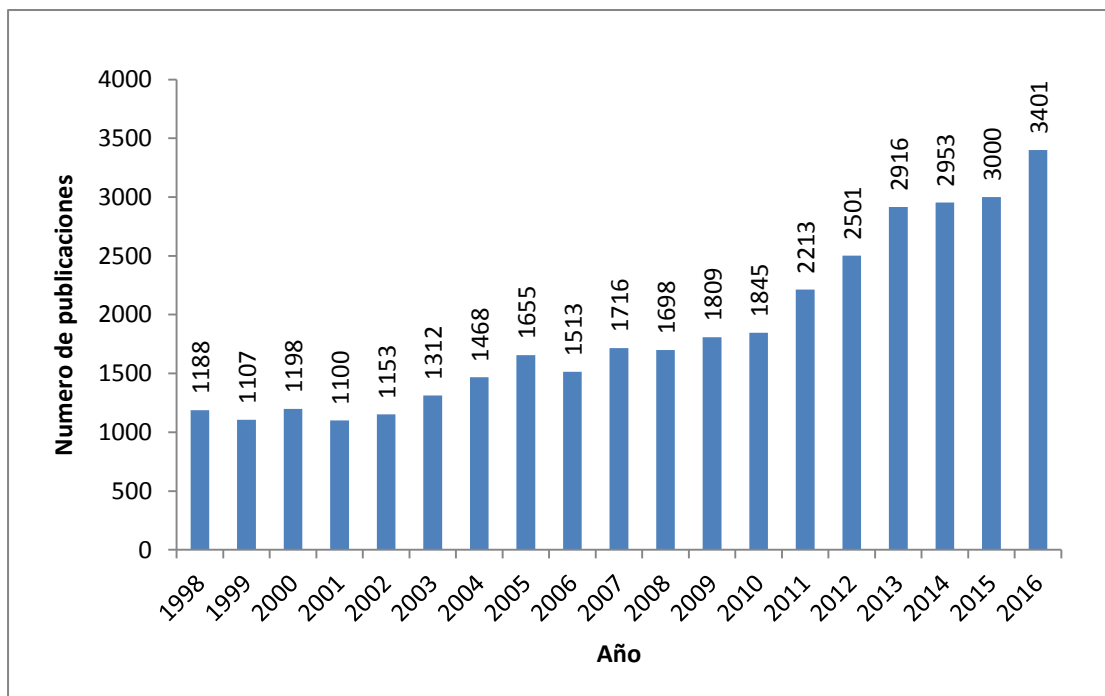


Figura No.3 Promedio anual (1998-2016) de publicaciones con la temática “supercritical fluid” (SF) en la base de datos Science Direct.

En Latinoamérica Brasil posee mayor cantidad de publicaciones que Colombia en la extracción con fluidos supercríticos (EFS). En Brasil las aplicaciones con base en EFS permitieron obtener 184 publicaciones durante el periodo comprendido entre 1994 y 2003 [13], creando las bases para trabajar en sistemas continuos de fabricación propia, con diagramas publicados [14],[15], al igual que colaborar en otros trabajos [16]. En el caso de Colombia se han publicado a nivel internacional solamente 9 artículos referentes a la EFS, siendo una cantidad baja, con respecto al total mundial cercano a 36 000 publicaciones. La comparación de Colombia respecto al mundo se fundamenta en la base de datos Science Direct, entre los años 1998 y 2016, ver figura No.3.

Los libros [17], [18] aportaron parámetros de trabajo para la construcción de equipos para extracción a alta presión; sin embargo en la práctica es necesario adaptar el material disponible. Los citados libros enuncian unos muy buenos parámetros, pero al llevarlos a la práctica se encuentran limitantes y estas se deben resolver con los recursos propios, consiguiendo generar las destrezas y habilidades que permiten llevar a buen término la aplicación del conocimiento.

Los fluidos supercríticos han sido ampliamente usados en procesos de obtención de extractos con actividad antioxidante, a partir de material vegetal [2] [16] [19] [20] [21] [22], como el caso de las semillas de guayaba (*Psidium guajava*), las semillas de tamarindo (*Tamarindus indica*), al igual que lo reportado para el mamoncillo (*Melicoccus bijugatus*), jack (*Artocarpus heterophyllus*), aguacate (*Persea americana Mill*), fruto de tamarindo (*Tamarindus indica*), limoncillo (*Citrus limon*), almendras (*Prunu samygdalus*), chile Jalisco (*Crotalaria longirostrata*), inga (*Inga uruguensis*), kiwi (*Actinidia chilensis*),

manzana (*Malus sylvestris*), pera (*Pyrus communis*), durazno (*Prunus persica*), guarana (*Paullinia cupana*).

2.3.2 Ventajas de la extracción con fluidos supercríticos (EFS)

Las ventajas más relevantes para la EFS son: (i) alta difusividad, que permite una gran movilidad de los analitos dentro del disolvente aumentando el flujo de masa con base en la ley de Fick. Un alto flujo implica menores tiempos de extracción en comparación con las técnicas clásicas. (ii) Baja viscosidad, que hace posible el ingreso del disolvente en cavidades pequeñas inaccesibles para un líquido, pero conservando la capacidad de solvatación del líquido, sin presentar un marcado comportamiento como flujo de Poiseuille. (iii) Extracción cuantitativa, al usar las condiciones adecuadas se alcanza esta condición en un menor tiempo del que sería necesario para una técnica clásica. (iv) Cambio en el poder de solvatación con base en los cambios de presión (P) y temperatura (T), con lo que mejora la selectividad. (v) Separación fácil del disolvente al trabajar con CO₂, ya que con solo despresurizar, se presenta el paso a estado gaseoso del CO₂. (vi) Dependiendo del disolvente usado se puede trabajar a baja temperatura, como es el caso cuando se trabaja con CO₂, permitiendo extraer moléculas termolábiles, que se degradan con otras técnicas de extracción, como hidrodestilación (HD), arrastre con vapor (AV) y destilación simple. (vii) Se requiere poca cantidad de muestra en comparación con las técnicas clásicas. Este aspecto es favorable para análisis de materiales escasos. (viii) Al usar poco disolvente se puede considerar una técnica amigable con el medio ambiente. (ix) La EFS permite acoples directos a técnicas de análisis tales como UV-Vis, FTIR, CG y CLAR entre otras. (x) Recirculación de disolvente. Aparte de que el CO₂ puede ser obtenido como residuo de algunos procesos industriales, también existe la posibilidad de reutilizarlo por condensación, quedando enmarcado en los principios de la química verde. (xi) A diferencia de otras técnicas modernas como la cromatografía y la microextracción en fase sólida, la EFS tiene la posibilidad de ser escalada a distintos niveles.

En el caso de la extracción Soxhlet (SH), la maceración, la extracción acelerada con disolvente o la lixiviación, el rendimiento se limita a la afinidad entre el disolvente y el soluto [7]. Al adicionar modificadores, en la EFS, es posible cambiar la afinidad entre las partes [8] [17]. Para el CO₂ los modificadores referenciados son el metanol [23] el etanol [14] [16] [24] [25] [26] [27] [28], la acetona [29], el acetato de etilo [27] entre otros. Pero también el agua que hace parte de la muestra puede cumplir el papel de modificador de polaridad [7]. Para evitar la interferencia del agua es posible usar deshidratantes como el sulfato de sodio (Na₂SO₄) anhidro y la silica gel [8].

2.3.3 Variables de trabajo

2.3.3.1 Relación entre densidad y presión

La zona gris claro de la figura No.4, que corresponde al dióxido de carbono (CO₂) supercrítico, relaciona la densidad con la presión, y permite establecer que al trabajar a la temperatura crítica, si se aumentara diez veces la presión reducida no se alcanza a

duplicar la densidad reducida, por lo que en el aspecto de compresibilidad el CO_2 supercrítico se comporta más semejante a un líquido que a un gas.

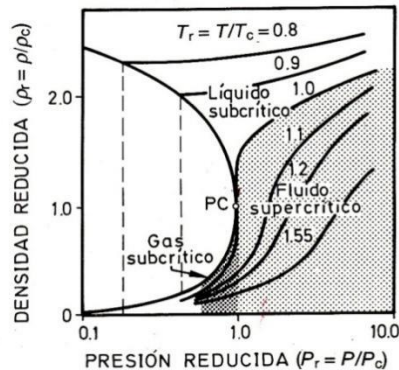


Figura No.4 Relación entre la presión reducida ($P_r = P/P_c$), y la densidad deducida ($\rho_r = \rho/\rho_c$) para CO_2 a diferentes temperaturas. Tomada de Luque de Castro 1993.

2.3.3.2 Relación entre presión, constante dieléctrica y densidad

Existe una relación entre la constante dieléctrica y la densidad respecto a la presión para el CO_2 en el estado supercrítico. Esta relación se ve reflejada en la figura No.5, donde se evidencia que a medida que aumenta la presión también aumenta la constante dieléctrica, en una proporción menor que la densidad, comportamiento que se acentúa entre los 100 y 200 bar.

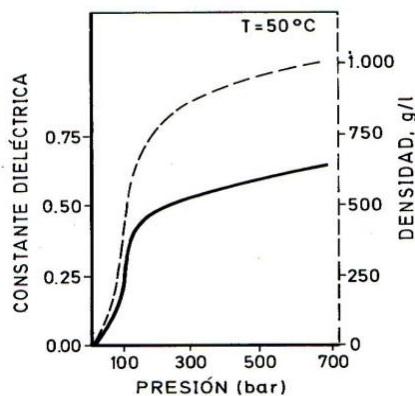


Figura No.5 Relación para el dióxido de carbono (CO_2) entre la presión y dos variables: la constante dieléctrica y la densidad. Tomada de Luque de Castro 1993.

2.3.3.3 Relación entre parámetro de capacidad disolvente y presión

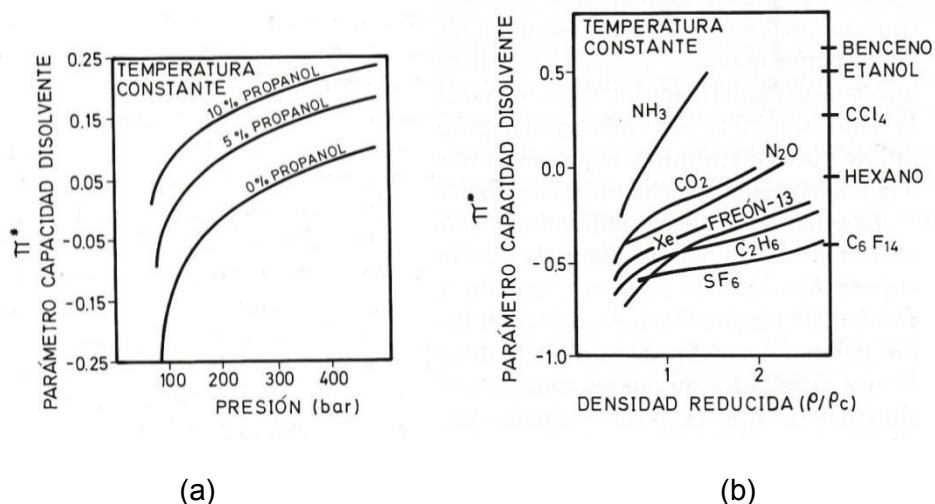


Figura No.6 (a) Relación entre la capacidad disolvente del CO₂ y la presión. (b) Relación entre la capacidad disolvente y la densidad reducida para distintos disolventes. Tomada de Luque de Castro 1993.

Trabajando con CO₂ como disolvente y propanol como soluto, a medida que aumenta la presión del CO₂ supercrítico mejora el parámetro de capacidad disolvente, como se observa en la figura No.6 (a). Por existir mayor número de partículas de disolvente por unidad de volumen, implica aumento de la densidad, permitiendo alta proximidad molecular del disolvente con el soluto y mayor interacción. Al tener la relación mostrada en la figura No.4 permite complementar y entender el comportamiento de la figura No.6 (b) ya que si aumenta la presión aumenta la densidad y por ende mejora el parámetro de capacidad de solvatación, no solo en el CO₂ sino en los demás disolventes.

2.3.3.4 Relación entre difusividad y temperatura

Como se puede observar en la figura No.7 la difusividad en el CO₂ aumenta con la temperatura y disminuye con la presión. La anterior observación se complementa con la figura No.8, en la cual se muestra el aumento de la viscosidad con el aumento de la presión. Al aumentar la viscosidad de un medio se reduce la movilidad de las partículas en dicho medio, pero si se aumenta la movilidad de las moléculas elevando la temperatura, es comprensible que la velocidad de propagación del soluto mejore.

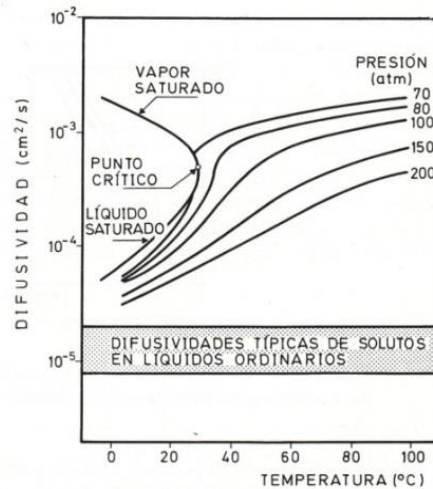


Figura No.7 Relación entre difusividad y temperatura para el CO_2 a diferentes presiones. Tomada de Luque de Castro 1993.

2.3.3.5 Relación entre viscosidad y presión

En la figura No.8 se muestra que cuando la presión aumenta la viscosidad también lo hace, aunque en menor proporción. Este comportamiento viene acompañado con una reducción en la difusividad, lo último se observó ya en la figura No.7. También en la figura No.8 se hace evidente que un aumento en la temperatura reduce la viscosidad, tendencia que se presenta por el aumento de la energía cinética de las partículas. Por lo dicho anteriormente, si se aumenta la presión, la difusividad y viscosidad pueden ser restablecidas con un aumento de temperatura.

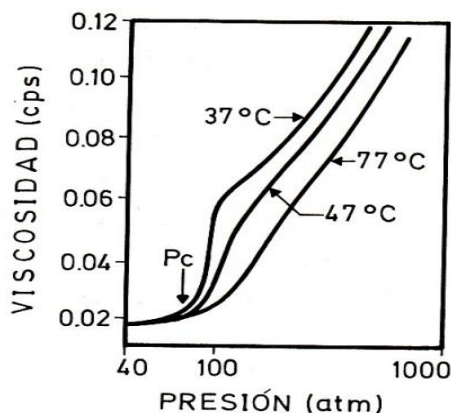


Figura No.8 Relación de la viscosidad a medida que cambia la presión, para tres diferentes temperaturas. Tomada de Luque de Castro 1993.

2.3.4 Propiedades de fluidos supercríticos comunes

Tabla No.2 Condiciones críticas de temperatura y presión, para algunas sustancias que pueden ser usadas como disolventes en extracción con fluidos supercríticos (EFS).

.Disolventes		Temperatura crítica (°C)	Presión crítica (bar)
Inorgánicos			
1	CO ₂	31,1	72
2	N ₂ O	36,5	70,6
3	NO ₂	158	98,7
4	Amoniaco	132,5	109,8
5	Agua	374,2	214,8
6	Hexafloruro de azufre	45,5	38
7	Helio	-268	2,2
8	Hidrogeno	-240	12,6
9	Xenón	17	56,9
10	Cloruro de hidrogeno	51	83,3
11	Dióxido de azufre	157	76,8
Hidrocarburos			
12	Metano	-82	46
13	Etano	32,3	47,6
14	Propano	96,7	42,4
15	n-Butano	152	70,6
16	Pentano	196	32,9
17	Hexano	234,2	28,9
18	2,3-Dimetilbutano	226,8	42,4
19	Eteno	11	50,5
20	Propeno	92	45,4
21	Benceno	288,9	98,7
22	Tolueno	319	41,1
Alcoholes			
23	Metanol	239	78,9
24	Etanol	243,4	72
25	Isopropanol	235,3	47,6
Éteres			
26	Dietileter	193,6	63,8
27	Etilmetileter	164,7	47,6
28	Tetrahidrofurano	267	50,5
Hidrocarburos halogenados			
29	Trifluorometano	26	46,9
30	Diclorodifluorometano	111,7	109,8
31	Diclorofluorometano	178,5	32,9
32	Clorotrifluorometano	28,8	214,8
33	Triclorofluorometano	196,6	28,9
34	1,2-Diclorotetrafluoroetano	156,1	78,9
Otros			
35	Acetona	235	47
36	Acetonitrilo	275	47
37	Piridina	347	56,3

Uno de los disolventes más utilizado en la EFS es el dióxido de carbono (CO_2) debido a que es gaseoso a condiciones estándar de presión y temperatura, además sus condiciones críticas son moderadas ($31,1\text{ }^\circ\text{C}$ y 72 bar), es de fácil adquisición, bajo costo, no es inflamable, explosivo, tóxico ni corrosivo. El paso del dióxido de carbono a estado gaseoso bajo condiciones estándar permite separar el disolvente del extracto por descompresión.

La clase de analitos que pueden ser extraídos mediante EFS desde una matriz, depende de la afinidad existente entre el disolvente y dichos analitos. La proximidad en el valor de los momentos dipolares es la base para establecer el tipo de extracto que se obtiene.

Tabla No.3 Momentos dipolares para algunos disolventes usados en EFS.

Momentos dipolares	
Fluido	Momento (debye)
CO_2	0
SF_6	0
Xe	0
Etano	0
n-butano	0
N_2O	0,2
Freón-12	0,2
Freón-11	0,5
Freón-22	1,4
NH_3	1,5
CHF_3	1,6
MeOH	1,7
EtOH	1,7
Et(Acet)	1,9

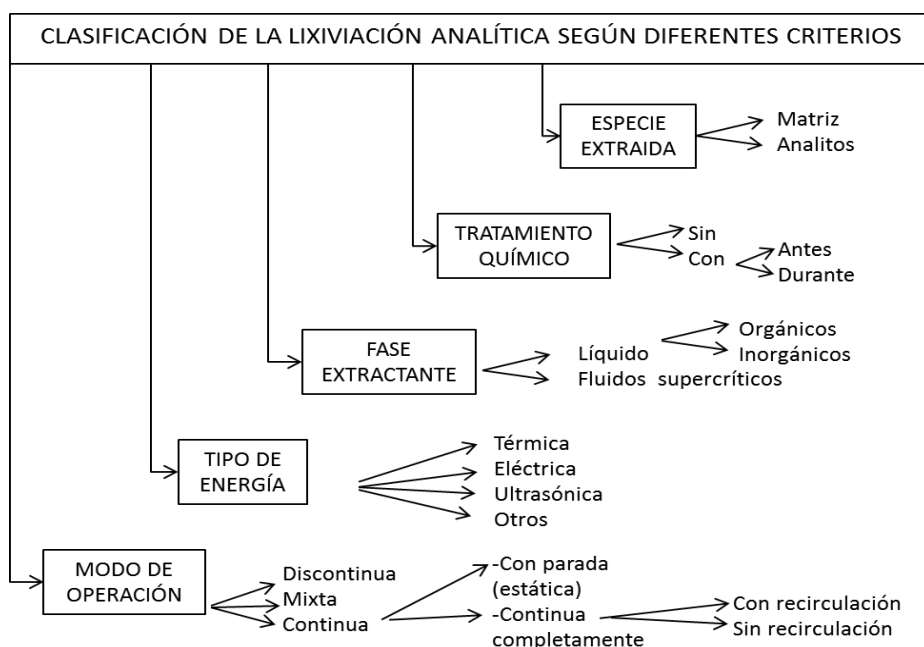


Figura No.9 Esquema de clasificación para métodos de extracción.

La afinidad entre los analitos y el disolvente usado puede ser modificada en algunos casos, como para el CO_2 , ya que como se muestra en la tabla No.3, en condiciones supercríticas existe selectividad de este disolvente hacia analitos de baja polaridad [12]. Las sustancias modificadoras de polaridad, al ser adicionadas permiten elegir la polaridad del extracto a obtener.

En el caso de extraer analitos desde un sólido con fluidos supercríticos se produce una lixiviación, según la clasificación dada en la figura No.9.

2.3.5 Sistemas de extracción discontinuos y de flujo continuo.

Los primeros trabajos reportados en la literatura, para EFS, fueron en modo discontinuo, también conocida como “por lotes” o “batch”. Sin embargo, la industrialización de los procesos se orienta hacia el trabajo en forma continua, permitiendo aumentar la producción, reducir costos y estandarizar más fácilmente los procesos.

El valor numérico para evaluar una extracción se puede simular mediante el proceso de transferencia de masa con la ayuda de la ecuación incluida en la gráfica No.10. Dicha ecuación se usa para las extracciones líquido-líquido, siendo modelada una extracción en la figura No.10, donde se plantea una concentración inicial de 300 unidades para un analito en el primer disolvente (fase 1), el analito tiene una afinidad diez veces mayor por el líquido extractante (fase 2). Evaluando la concentración remanente en la fase 1 y manteniendo en 50 mL el volumen total (suma de volúmenes de las porciones) de la fase 2 usada para realizar la extracción, se toma como variable independiente en la gráfica No.10 el número de porciones en las cuales se dividen los 50 mL, dejando que en cada

caso se llegue al equilibrio y retirando posteriormente el líquido extractante, para colocar una nueva porción de éste.

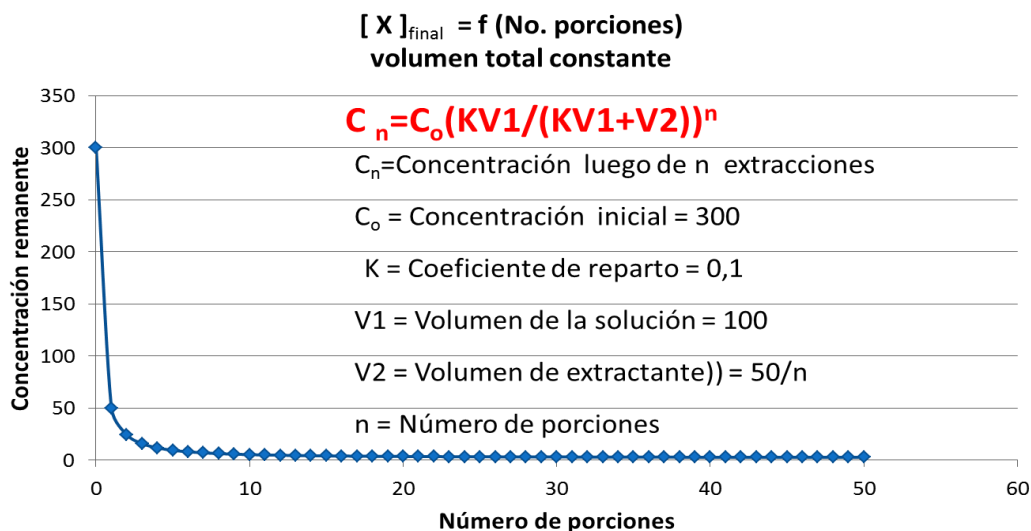


Figura No.10. Cambio en la concentración final de un analito dentro del líquido de partida al variar el número de porciones en la que se divide el líquido extractante.

La extracción exhaustiva al usar EFS fue confirmada experimentalmente. La viabilidad presentada por parte de los métodos de extracción con fluidos supercríticos en flujo continuo de disolvente (EFSFC) fue reportada por varios autores [9] [11] [14] [29] [30] [31] [32].

Grupos de investigación colombianos, en trabajos anteriores [2] [19] [20] [21] , y utilizando EFS, al trabajar en modo discontinuo, han obtenido extractos con actividad biológica, a partir de semillas de guayaba (*Psidium guajava*) procedentes de la industria productora de bocadillos, este método también ya ha sido aplicado, por otro grupo, a esa misma matriz.

2.3.6 Esquema básico de un equipo para EFS

El equipo debe cumplir las siguientes exigencias: (i) suministrar el disolvente en forma controlada, (ii) elevar la presión del disolvente de acuerdo al requerimiento, (iii) contener la matriz (sólida o líquida) de la cual se obtiene el extracto, (iv) elevar la temperatura hasta el valor esperado, (v) retirar el extracto mezclado con el disolvente y (vi) separar el disolvente del extracto, esto último en caso de que sea posible.

Los elementos básicos y comunes necesarios para un equipo de EFS se muestran en la figura No.11. Entre los equipos en régimen discontinuo y el equipo en flujo continuo existen piezas con funciones comunes, lo cual no implica que sean las mismas. Las partes básicas de un equipo son: (i) el reservorio del disolvente, (ii) la bomba o

compresor para el aumento de presión, (iii) la cámara de extracción o lugar donde ocurre la extracción, (iv) el horno de calentamiento y (v) el separador.

En caso de tener un equipo que permita suministrar modificador de polaridad se hace necesario tener la forma de dosificarlo e incorporarlo a alta presión. Igualmente se puede considerar un lugar de premezcla, para homogenizar la mezcla de disolvente y modificador antes de llegar a la cámara de extracción.

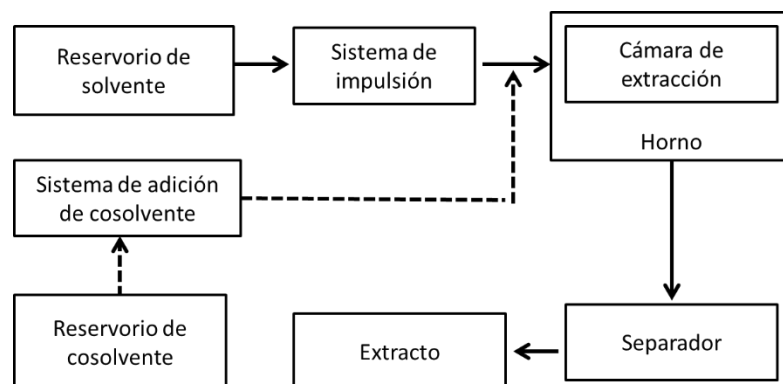


Figura No.11 Esquema general para un equipo de extracción con fluidos supercríticos (EFS).

La línea punteada en la figura No.11 corresponde a la parte adicional que debe ser considerada cuando se trabaja con modificador de polaridad.

También es necesario en los sistemas de flujo continuo conservar una presión constante en el sistema, controlando la velocidad de la entrada y salida de la fase extractante. El objetivo de regular la presión se puede hacer por medio de una válvula de regulación de presión anterior (*back pressure regulator*, BPR) o mediante restrictores de flujo.

2.3.7 Partes del equipo

El equipo para EFSFC se proyectó para ser versátil y los esquemas que permitieron realizar una parte de la proyección están reportados en las revistas especializadas [2] [7] [12] [14] [15] [19] [21] [31] [33], también se tuvieron en cuenta los equipos preexistentes dentro del grupo de investigación al igual que en los descritos en libros especializados [17] [18].

Algunos aspectos a tener en cuenta son: (i) los elementos del equipo sometidos a presión y que tiene forma cilíndrica, permiten reducir los concentradores de esfuerzos, (ii) la compatibilidad de los materiales metálicos en contacto es importante a largo plazo. En caso de contacto entre metales puros o aleaciones sin igual composición, es necesario disminuir la posibilidad de reacciones redox, es decir la presencia de un par galvánico.

(iii) Los coeficientes de dilatación con una marcada diferencia, hacen que las piezas en contacto aumenten o disminuyan sus dimensiones en porcentajes distintos, dando lugar a fugas o desajustes, por lo cual es recomendable trabajar en un solo material [18]. (iv) Los orificios de entrada y salida en una pieza de unión requieren co-linealidad entre ellos, de lo contrario esto puede ser una fuente de pulsaciones o vibración durante el paso del fluido. (v) Adicionalmente, es necesario tener en cuenta que la tubería de bajo diámetro y gran longitud da origen a fuertes caídas de presión. (vi) Finalmente, las férulas y demás piezas usadas para el equipo deben ser especificadas para la presión de trabajo (alta presión: máximo 1034 bar, diámetro ¼" y temperatura ambiente).

El orden en el cual se presentan las partes obedece al orden en el que se encuentran ensambladas las piezas del aparato, recorriendo desde el reservorio del dióxido de carbono hasta su salida al medio ambiente.

2.3.7.1 Reservorios de disolvente y modificador

Para el caso de aparatos de EFS que trabajan en régimen discontinuo, no se requiere un reservorio de disolvente con alta capacidad, ya que es posible cambiar el depósito de disolvente en medio de la extracción. Mientras que para el equipo de extracción con fluidos supercríticos en flujo continuo (EFSFC), se requiere mayor capacidad del reservorio.

El disolvente y el modificador de polaridad, deben estar en suficiente cantidad para las bombas, pues si se agotan, estas succionan aire con lo que se presenta la compresión y descompresión de un gas, reduciendo o anulando el flujo de líquido. Los valores para el flujo de CO₂ en sistemas para EFSFC se reportan desde 2,1 hasta 60 g CO₂ / h* g muestra [29] [30]. Cuando el disolvente es CO₂, es preferible suministrarlo en estado líquido, utilizando un cilindro con tubo inmerso, claro que en caso de no tener esta clase de cilindro se puede reemplazar por un cilindro invertido. Con el fin de garantizar suministro de CO₂ líquido se puede usar una zona de enfriamiento a la salida del cilindro. Una forma de suministrar el CO₂ líquido sin requerir zona de refrigeración es con una elevada presión en el cilindro, lo que se logra al usar helio en la cabeza del cilindro, llegando incluso a evitar el uso de una bomba o compresor.

2.3.7.2 Tubing y uniones

El material más usado en la elaboración de aparatos para EFS es el acero inoxidable 316, teniendo en cuenta su baja reactividad. En ductos y recipientes cilíndricos el diámetro pequeño permite resistir mayores presiones a pesar de tener el espesor y el material constantes. Sin embargo un diámetro muy bajo incrementa el comportamiento como flujo de Poiseuille, con la consecuente acumulación en las paredes del ducto.

2.3.7.3 Sistema propulsor de disolvente

Una bomba funciona solo suministrando líquidos, mientras que un compresor puede suministrar tanto gases como líquidos. En sistemas simples es común ver el uso de bombas tipo jeringa o bombas de doble pistón [17]. La ventaja de las bombas de doble pistón es que reducen las oscilaciones en el suministro de disolvente, ya que los pistones se desfasan 180 °, siendo referenciados como pistones recíprocos.

Un compresor puede funcionar como tal al recibir gas o como bomba si entra un líquido. En caso de ser necesario bombear CO₂ líquido, debe usarse un sistema refrigerante, como se mencionó anteriormente, que asegure la llegada del CO₂ en estado líquido. La zona de refrigeración debe estar por debajo de 4 °C, ya que es la temperatura de equilibrio S-L para el CO₂, a la presión dentro del cilindro.

2.3.7.4 Adición del modificador de polaridad

En el caso de ser necesario el uso de un modificador de polaridad, este se puede adicionar de distintas formas: (i) realizando la premezcla del disolvente con el modificador de polaridad, teniendo como limitante la compatibilidad entre ellos, pero esta forma de mezclarlos permite garantizar una proporción fija. (ii) Para el caso de usar disolventes gaseosos, éste se puede hacer pasar por un lecho de modificador con el fin de que el modificador de polaridad sea arrastrado por el disolvente. (iii) Colocando el modificador dentro de la cámara de extracción antes de cerrarla. Al igual que en el primer caso esto impide el cambio de relación disolvente-modificador, con el agravante de que el modificador puede ser arrastrado mecánicamente al trabajar en flujo continuo. (vi) Tener dos bombas independientes, una para el disolvente y otra para el modificador de polaridad. En esta forma de mezcla es habitual suministrar el modificador con bombas de bajo flujo, para extracciones a escala de laboratorio comúnmente se usan bombas tipo cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). La bomba de CLAR debe tener una presión máxima superior a la presión de trabajo y presentar una válvula unidireccional (cheque) para evitar el retorno de modificador hacia la bomba.

2.3.7.5 Cámara de extracción

La cámara de extracción, también conocida como reactor, es el lugar donde ocurre la extracción propiamente dicha, por lo que es de suma importancia caracterizar este elemento. Antes de usar una cámara de extracción, se recomienda purgarla a 20 °C por encima de la temperatura de trabajo, con el disolvente de va usar. Los recipientes desocupados de las columnas y precolumnas para CLAR pueden ser usadas como cámaras de extracción de bajo volumen. Para todas las cámaras de extracción se espera que presenten características como: (i) fácil apertura y cierre, que conlleve un cambio rápido de la muestra, (ii) sellado sencillo pero seguro, sin necesidad de herramientas o procedimientos especiales, (iii) no usar filtros en acero (poroso), que son dispendiosos en su limpieza o pueden presentar amenaza de contaminación cruzada, (iv) fácil de desmontar del equipo, permitiendo cambiar las cámaras de extracción. (v) Volumen

interno variable. En caso de ser necesario reducir el volumen de la cámara de extracción, puede optarse por rellenos inertes, como lo propone comercialmente Hewlett Packet y (vi) soportar presiones superiores a la presión de trabajo.

El cierre de la cámara de extracción por roscado como se presenta en la figura No.12, hace más dispendioso el cambio de muestra y genera desgaste en las roscas, por uso.

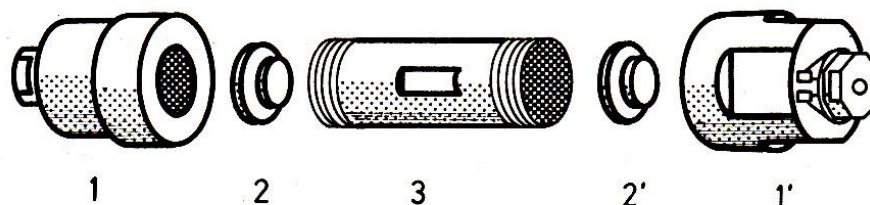


Figura No.12. Esquema de una cámara de extracción clásica usada en EFS. Tomado de Luque de Castro (1993).

En la figura No.12 se tienen cierres roscados mediante los tapones 1 y 1'. Internamente, 2 y 2' son tapas de precinto con acero sinterizado, 3 es cuerpo de la cámara de extracción.

El volumen de las cámaras de extracción usadas en pruebas de laboratorio varía desde 10 μL [17] hasta 100 mL. Algunos factores a considerar en la elección del volumen de la cámara de extracción son: (i) la matriz a trabajar, ya que la densidad es muy variable entre las matrices. (ii) La cantidad necesaria de extracto para el propósito fijado, con base en un valor esperado de rendimiento y las pruebas a realizar para dicho extracto. (iii) La relación del volumen de la cámara con respecto al peso de la muestra no debe ser ni muy grande ni muy pequeña y es propia para cada cámara de extracción. Cámaras pequeñas mejoran el porcentaje de extracción y la precisión [17].

2.3.7.5.1 Flujo en la cámara de extracción

Dentro de las cámaras de extracción se busca tener un flujo turbulento con el fin de mejorar el proceso de extracción [29], evitando que la única fuerza impulsora para el transporte de masa, sea la diferencia de concentraciones. Cuando se trabaja en flujo laminar se presenta el efecto difusivo en la interfase entre la matriz y el extractante, como se muestra en la figura No.13.

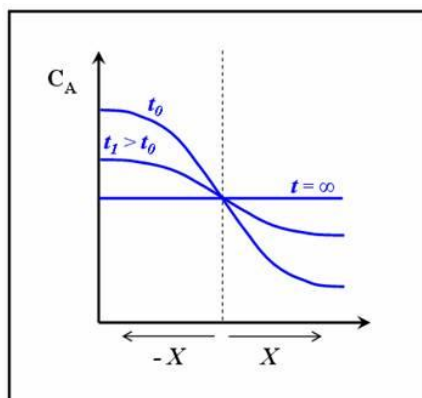


Figura No.13. Perfiles de concentración en la interfase a diferentes tiempos considerando iguales coeficiente de difusión en dos fases inmiscibles.

Dentro de la figura No.13 se tiene el tiempo (t) transcurrido después de poner en contacto las dos fases: t_0 , primer estado reportado. t_1 , pasado un tiempo después de t_0 pero conservando diferencias de concentración. t_∞ cuando transcurre mucho tiempo y llega al equilibrio. Imagen adaptada de http://ocwus.us.es/arquitectura-e-ingenieria/operaciones-basicas/contenidos1/tema11/pagina_02.htm, consultada el 20 de marzo de 2016.

Es posible evaluar el comportamiento de un fluido con base en un parámetro adimensional conocido como número de Reynols, nombrado así en honor a Osborne Reynols (1824) ingeniero y físico irlandés, quien estudio el comportamiento de los fluidos. Cuando dicho parámetro es menor a 2100 se tiene un comportamiento de tipo laminar donde las partículas tiene un movimiento predominantemente axial al ducto que la contiene. Cuando el valor está por encima de 4000 se tiene la certeza que se comporta de forma turbulenta y errática. La ecuación No.1 permite establecer el valor para el número de Reynols. Dentro del rango entre 2100 y 4000 no se puede establecer a priori el comportamiento del fluido.

$$Nre = \frac{\text{fuerzas inerciales}}{\text{Fuerzas viscosas}} = \frac{\rho DV}{\eta} \quad \text{Ecuación No.1} = \text{Número de Reynols}$$

Donde Nre es el numero adimensional de Reynols. ρ es la densidad del fluid

o, D corresponde al diámetro del ducto, en caso de ser cilíndrico o el diámetro equivalente en una geometría distinta. V expresa la velocidad media de las partículas, considerando que el fluido en la pared del ducto permanece inmóvil (flujo de Poiseuille). η es la viscosidad del fluido, para las condiciones de trabajo.

Un flujo muy alto en la cámara de extracción reduce el tiempo de contacto entre el fluido supercrítico y la muestra con lo que se requiere demasiada fase extractante.

2.3.7.5.2 Geometría de la cámara de extracción

Las cámaras de extracción cilíndricas se prefieren, ya que dicha geometría evita zonas de poca agitación y concentradores de esfuerzo. Estos últimos reducen la resistencia de la cámara ante la presión interna. El ingreso del disolvente o disolventes se realiza, en

algunos casos, por la parte superior y la salida por la parte inferior [17] y en otros casos se realiza de forma contraria, pero por la parte central de la base o la tapa de la cámara de extracción. Para aumentar la turbulencia es posible hacer el ingreso o la salida lateral, dejando así la oportunidad de retirar rápidamente la tapa para cambiar la muestra, sin desmontar el reactor.

Aunque el sentido común puede orientar hacia la fabricación de cámaras de gran longitud y poco diámetro, con el fin de aumentar el tiempo de contacto entre el extractante y la matriz, las cámaras de extracción alargadas no son recomendables ya que reducen el rendimiento de la extracción, según se comparan dos cámaras de igual volumen, pero con relaciones diámetro interno-longitud de 1:1 y 1:20, resultados que se muestran en la figura No.14 [17].

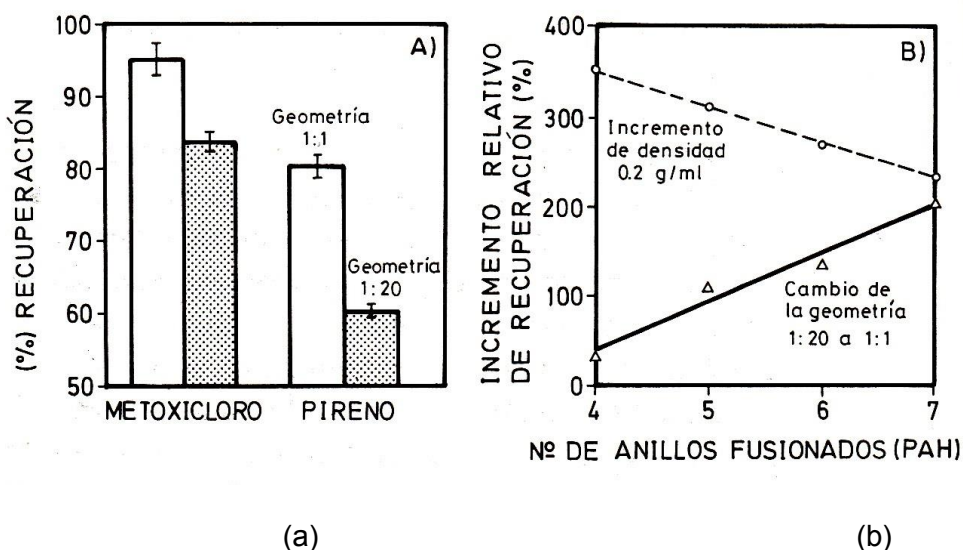


Figura No.14 Porcentaje de recuperación para metoxicloro y pireno con el cambio de la relación diámetro a volumen. Tomado de Luque de Castro et al, 1993.

La proporción que guardan las medidas del diámetro y la altura para un reactor usado en EFS, es determinante en el porcentaje de recuperación de los analitos, como se observa en la figura No.14 donde se muestra: (a) Cambio en el porcentaje de recuperación para metoxicloro y pireno al variar la relación diámetro a altura. (b) Incremento relativo de recuperación a medida que cambia la cantidad de anillos fusionado con geometrías diámetro a volumen variantes en la cámara de extracción de 1:20 y de 1:1.

Para evitar taponamientos, al obtener extracto a partir de matrices sólidas, se recomienda la entrada de extractante por la parte inferior de la cámara, como se presentará en la figura 27 (b), teniendo como beneficio adicional un lecho fluidizado. La entrada de fase extractante por la parte inferior también posibilita obtener extractos partiendo de muestras líquidas, debido a que por la baja densidad de un fluido supercrítico, éste tiende a ascender y salir por la parte superior. La desventaja del ingreso de fluido por la parte inferior es la posible acumulación de sustancias no volátiles, como es el caso de modificadores de polaridad, lo que implica el cambio de condiciones de extracción.

2.3.7.5.3 Sellado de la cámara de extracción

La superficie del sellado para la cámara de extracción en algunos casos se realiza metal-metal y en otros metal-polímero. En el primer caso son roscas NPT como se mostró en la figura No.12, pero esa forma de sellado presenta el inconveniente de tener que desenroscar cada vez que se desea cambiar la muestra, con el consiguiente desgaste y tiempo prolongado de cambio. Para el segundo caso el material más usado es teflón (politetrafluoroetileno-PTFE), debido a que no cambia sus dimensiones por descompresión. Dicho cambio en las dimensiones se presenta en materiales como el caucho y el vitón.

2.3.7.5.4 Terminado superficial de la cámara de extracción

Las rugosidades e imperfecciones superficiales funcionan como concentradores de esfuerzos, que reducen el tiempo de vida útil de la cámara de extracción y aumentan el riesgo de accidentes. La figura No.15 muestra la forma como la terminación superficial afecta la resistencia de una probeta ante la fatiga. Se graficó el esfuerzo de fatiga en función del número de ciclos para una probeta sin terminación y tres más con distinta terminación superficial.

El autoenzunchado es un procedimiento en el que el recipiente es sometido a una sobre presión que lo deforma plásticamente, orientando el material y aumentando la resistencia a la fatiga.

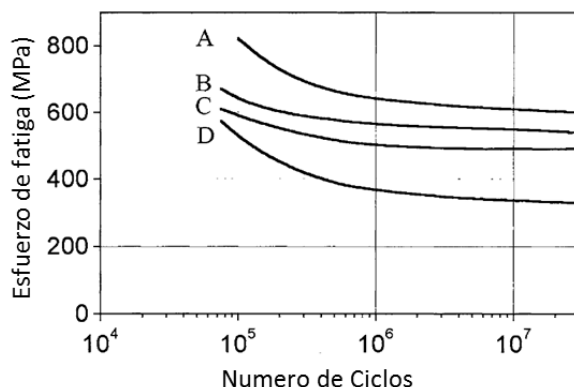


Figura No.15 Cambio en la resistencia a la fatiga de un material con base en la terminación superficial recibida. Tomado de Bertuccio y Vetter (2001).

Dentro de los posibles tratamientos superficiales dados a los reactores que son sometidos a presión se puede ordenar cuatro de ellos en forma ascendente de acuerdo a su resistencia ante la fatiga: D, Sin terminación superficial especial < C, Electropolichado < B, Nitrurado < A, Autozunchado.

2.3.7.5.5 Agitación en la cámara de extracción

La agitación mecánica en las cámaras de extracción que trabajan a altas presiones es compleja, ya que los ejes son difíciles de sellar, haciendo poco viable el uso de ejes que pasen de la zona de alta presión a la de baja presión o presión atmosférica. Para solucionar este inconveniente se han diseñado mecanismos de transferencia de movimiento por medios magnéticos, pero los altos costos de estos mecanismos limitan su uso.

2.3.7.5.6 Asistencia con ultrasonido

Una forma de mejorar la transferencia de masa en las cámaras de extracción y que aumenta la eficiencia en las extracciones es el uso de ultrasonido, pero, al igual que en el caso de la agitación mecánica, el costo es restrictivo. El ultrasonido presenta limitaciones en la intensidad, puesto que la energía suministrada a la cámara de extracción debe disiparse, lo cual puede generar condiciones para la degradación del extracto o la generación de artefactos por reacción química. Al usar ultrasonido se puede presentar el efecto de la cavitación, con lo cual aumenta la posibilidad de generar degradación de las superficies del reactor, junto con la dificultad de mantener la hermeticidad del aparato al estar sometido a vibración.

2.3.7.6 Mezclador de disolvente y modificador

La mezcla extractante debe llegar homogénea a la cámara de extracción sin tener un largo trayecto. Para reducir el volumen entre el punto de mezcla y el reactor se usan homogenizadores en el trayecto. Hay dos clases de homogenizadores: (i) dinámicos, en los cuales mediante movimiento se induce la homogeneidad de la mezcla y (ii) estáticos, en donde la geometría tortuosa de un segmento mejora las condiciones de mezclado.

2.3.7.7 Calentamiento

Comúnmente el calentamiento se enfoca en la cámara de extracción. Sin embargo hay otras zonas que pueden requerir de calentamiento, como las válvulas, los ductos y el mezclador.

Debido a la necesidad de calentar el sistema para llegar a condiciones críticas, se usan distintos métodos como: (i) calentamiento con baño termostatado, como algunos autores lo presentan [27] [29], con la limitante de organizar todas las partes del instrumento para que los controles queden fuera del líquido calefactor. (ii) Es posible usar aire caliente al introducir el aparato dentro de un horno [23], [34], teniendo como limitante el gran tamaño del horno y la manipulación de válvulas calientes. (iii) El uso de resistencias eléctricas que envuelven las partes a calentar. Como precaución para ésta última posibilidad se encuentra el aislamiento con materiales resistentes a altas temperaturas y con alta resistividad, evitando quiebres que generen sitios de alta disipación. Para todos los casos la respuesta rápida de los sensores de temperatura favorece el control [34].

En aquellos equipos de flujo continuo con recirculación (recuperación del CO₂), no solo se requieren zonas de calentamiento, sino que también se necesitan zonas de refrigeración. La disposición para las zonas de condensación del CO₂ puede tener diferentes configuraciones [12].

2.3.7.8 Válvulas

Una válvula en general es un elemento, mecánico o electromecánico, que permite cambiar el flujo con base en la restricción del paso de un fluido. La válvula mecánica reduce el área por la que se permite pasar el fluido, mientras que la electromecánica abre y cierra con distinto tiempo para cada etapa, controlando el flujo con base en la relación de dichos tiempos.

2.3.7.8.1 Válvulas cheque o unidireccionales

Una válvula cheque es un aditamento que permiten la circulación del fluido en una sola dirección, mediante sellos que se abren y cierran automáticamente. Los elastómeros (caucho, vitón, etc) al trabajar con CO₂, en EFS absorben el dióxido de carbono, pero cuando se presenta una descompresión súbita, el CO₂ pasa a estado gaseoso y expande el elastómero hasta la zona de deformación plástica, cambiando sus dimensiones permanentemente.

2.3.7.8.2 Válvulas on-off

Esta clase de válvulas solamente deben ser usadas para apertura o cierre total, ya que no tienen la exactitud necesaria para controlar el flujo. Un error grave en estas válvulas es la postura con la dirección del flujo en forma contraria, lo que da un fuerte golpe (golpe de ariete) al momento de abrir el paso de fluido. Otro error común es realizar un exceso de fuerza al cerrarla con la consecuente deformación de la base, en donde ocurre el sello por la junta metal-metal. El exceso de fuerza deforma irremediablemente las piezas.

2.3.7.8.3 Válvulas de seguridad

Con el fin de evitar sobrepresiones en el sistema se opta por tener un medio para reducir un exceso de presión, para tal fin se pueden usar dos diferentes clases de válvulas de seguridad: (i) Válvulas de ruptura, que tienen un disco que funciona como un fusible mecánico, ya que al llegar a una determinada presión se rompe y deja escapar fluido para reducir la presión. (ii) Válvulas de alivio, regulada por un resorte, cuya constante K, junto con un tornillo, permiten graduarla para que sufra una apertura automática, al llegar al máximo valor permitido.

2.3.7.8.4 Válvula de regulación de presión anterior (BPR)

Al trabajar en flujo constante y con el fin de realizar el control de la presión dentro del aparato se puede optar por dos posibilidades: (i) una válvula de regulación de presión anterior (BPR) o (ii) un restrictor. La válvula de regulación de presión anterior (BPR) funciona como un regulador de presión, en donde mediante una perilla se regula la fuerza que ejerce un resorte sobre una membrana, que a su vez regula la entrada de fluido. La cavidad interior de la BPR aumenta, en parte, el volumen muerto del equipo. El lavado interno con disolvente permite retirar el material residual dentro de los ductos y aditamentos, evitando la contaminación cruzada. Aunque la BPR tiene un alto costo, es un recurso disponible para este trabajo.

La BPR requiere supervisión constante por parte de un operador. El modo de trabajo en esta válvula hace que a medida que se reduce la presión anterior aumente el flujo, con el aumento del flujo se reduce más la presión y continúa el círculo vicioso. En el caso contrario, de aumento de presión, también ocurre un problema de disminución en el flujo.

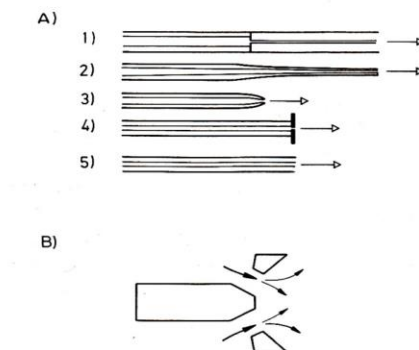


Figura No.16. Formas de restrictores. Restrictores de flujo fijo (A) y flujo variable (B). Tomado de Luque de Castro (1993).

Como alternativa a una válvula BPR, se presentan los restrictores de flujo, con diferentes geometrías, según se muestra en la figura No.16, que limitan el flujo con base en la reducción del diámetro interno a la salida del aparato. Algunos restrictores se fabrican, relativamente, de forma sencilla, por la deformación plástica de un tubo caliente sometido a tensión. Los que presentan una terminación plana evitan la formación de CO_2 sólido, pero su fabricación es más laboriosa.

Para el caso de los restrictores de flujo constante (Figura No.16 (A)) no se pueden hacer cambio o calibraciones teniendo la presión fija, mientras que en el caso de restrictores de flujo variable (figura No.16 (B)) sí es posible modificar las dimensiones del orificio de salida, mejorando las posibilidades para establecer el flujo deseado.

Con el fin de evitar la formación de taponamientos en los restrictores algunos autores sugieren calentarlos [23] [30], sin embargo no se puede cometer el error de calentar el restrictor por encima de la temperatura de extracción [30], ya que se corre el riesgo de dañar las sustancias termolábiles del extracto [7].

2.3.7.9 Sistema colector del extracto

Hay distintas formas de coleccionar el extracto, dependiendo de las características que tiene el mismo [17]. (i) Para compuestos muy volátiles, pero altamente solubles, se recomienda ser colectados por burbujeo en un disolvente en el cual tienen alta solubilidad. (ii) Adsorber sobre un sólido con afinidad por los analitos de interés. (iii) La forma más común de coleccionar los extractos de EFS teniendo CO_2 como disolvente, es la descompresión dentro de un recipiente, con lo que el CO_2 pasa a estado gaseoso y las sustancias que no lo hacen, quedan en el recipiente.

2.3.7.10 Medidor de flujo

Para realizar la medida de flujo se puede hacer mediante: (i) rotámetro, (ii) controlador de flujo másico, (iii) pérdida de peso en el reservorio del disolvente o (vi) anemómetro entre otros.

Con el fin de comparar los flujos másicos que se reporta para CO₂ usados por unidad de tiempo para un gramo de muestra, dentro de estos datos están 0,67 [14], 2,1 [29], 2,8 [29], 3,9 [11], 5,3 [35], 9 [24], 15 [24] [27], 25 [16], 30 [9], 40 [9] hasta 60 [30] g CO₂ / h* g muestra. Para el presente trabajo se tomó como referencia a Castro [16] con 25 g CO₂ / h* g muestra.

2.3.8 Rendimiento y calidad de los extractos

Existen diferentes parámetros para establecer el desempeño de los equipos utilizados para EFS. Dichos parámetros permiten comparar los aparatos entre sí, al realizar extracciones bajo las mismas condiciones de trabajo, con iguales matrices a extraer.

2.3.8.1 Rendimiento

Para establecer el rendimiento en un proceso se puede hacer mediante la fracción o el porcentaje. Los porcentajes se clasifican en dos distintos según se sustraiga el agua (base seca) o no (base húmeda). El porcentaje de rendimiento en base seca se obtiene con la ecuación No.2 en términos de masa, así:

$$\%R = \frac{m_E}{m_M} * 100 \quad \text{Ecuación No.2 = porcentaje de rendimiento}$$

Donde: %R=Porcentaje de rendimiento; m_E = Masa del extracto y m_M = Masa de la muestra seca.

2.3.8.2 Calidad

La calidad depende de los propósitos buscados para el extracto. La actividad biológica de un extracto puede ser: (i) Actividad anti-oxidante (A.A.), que consiste en la posibilidad de proteger moléculas susceptibles de ser oxidadas, al ser expuestas en un ambiente oxidante. (ii) Actividad anti-cáncer, probada al exponer tejidos enfermos y seguir su evolución. (iii) Actividad anti-tumoral, que se explora al someter a un individuo con tumores al tratamiento con los extractos. (iv) Actividad anti-inflamatoria, con esta característica se busca reducir la inflamación que presenta un animal. Estas son algunas de las actividades que puede presentar un extracto. Especial interés despierta la actividad anti-oxidante debido a la posible relación que tiene en la reducción de la enfermedad del cáncer, envejecimiento y protección de productos perecederos.

Un mecanismo propuesto por el cual se presenta la degradación de las grasas, consiste en la peroxidación lipídica, en la cual los radicales libres reaccionan con las insaturaciones de los ácidos grasos, presentes en los aceites vegetales, desencadenando una serie de reacciones que contribuyen al deterioro de esta clase de alimentos, tal como se aprecia en la figura No.18. De este modo, la función de un antioxidante consiste en inhibir los radicales libres, definiéndose un antioxidante como

toda aquella sustancia que, en bajas concentraciones comparadas con las del sustrato oxidable, evitan o atenúa el proceso de oxidación. El grado de protección que brinda una sustancia puede ser determinado con base en la concentración de los productos secundarios de la oxidación, o también mediante el seguimiento de moléculas susceptibles a procesos oxidativos.

Inicialmente es necesario considerar la estructura de los analitos de interés dentro de los extractos a obtener con A.A. La mayor parte de las sustancias con A.A. son de tipo fenólico, como se muestra en la tabla No.4. Al igual que con los alcoholes, los fenoles tienden a aumentar la solubilidad en disolventes de baja polaridad a medida que aumenta el grado de esterificación del grupo hidroxilo (- OH). A modo de ejemplo se puede citar el caso del fenol soluble al 3% en CO₂, mientras que el anisol es totalmente miscible en el mismo disolvente [17]. Lo anterior se visualiza al observar las estructuras de ambos solutos mostrados en la figura No.17.

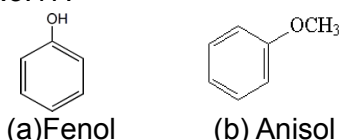

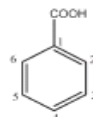

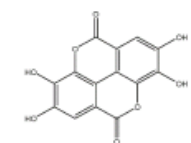
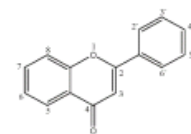
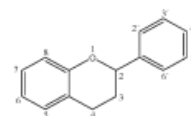


Figura No.17 Estructuras para (a) el fenol y (b) anisol. El cambio estructural afecta la solubilidad en CO₂ supercrítico.

Tabla No.4 Familias de compuestos con A.A.

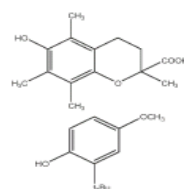
No.	Compound	Substituent	Structures
Benzenes			
1	Catechol	1,2-OH	
2	<i>p</i> -Hydroquinone	1,4-OH	
3	Pyrogallol	1,2,3-OH	
4	Phenol	1-OH	
5	Guaiacol	3-OH,4-OCH ₃	
6	Eugenol	1-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ ,3-OCH ₃ ,4-OH	
Benzoic acids			
7	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	4-OH	
8	Vanillin	3-OCH ₃ ,4-OH	
9	Syringic acid	3,5-OCH ₃ ,4-OH	
10	Protocatechuic acid	3,4-OH	
11	Gallic acid	3,4,5-OH	
12	<i>p</i> -Coumaric acid	4-OH, R = H	
13	Ferulic acid	3-OCH ₃ ,4-OH, R = H	
14	Sinapinic acid	3,5-OCH ₃ ,4-OH, R = H	
15	Caffeic acid	3,4-OH, R = H	
16	Chlorogenic acid	3,4-OH, R = quinic acid	

Flavans		
17	(+)-Catechin	3,5,7,3',4'-OH
18	(-)-Epicatechin	3,5,7,3',4'-OH
Flavonols		
19	Quercetin	3,5,7,3',4'-OH
20	Rutin	5,7,3',4'-OH, 3'-rutinoside
Tannin		
21	Ellagic acid	



Continúa Tabla No.4 Familias de compuestos con A.A.

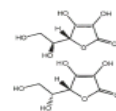
22	Trolox
23	3- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxyanisole



Non-polyphenols	
24	L-cysteine



25	L-ascorbic acid
26	D-ascorbic acid



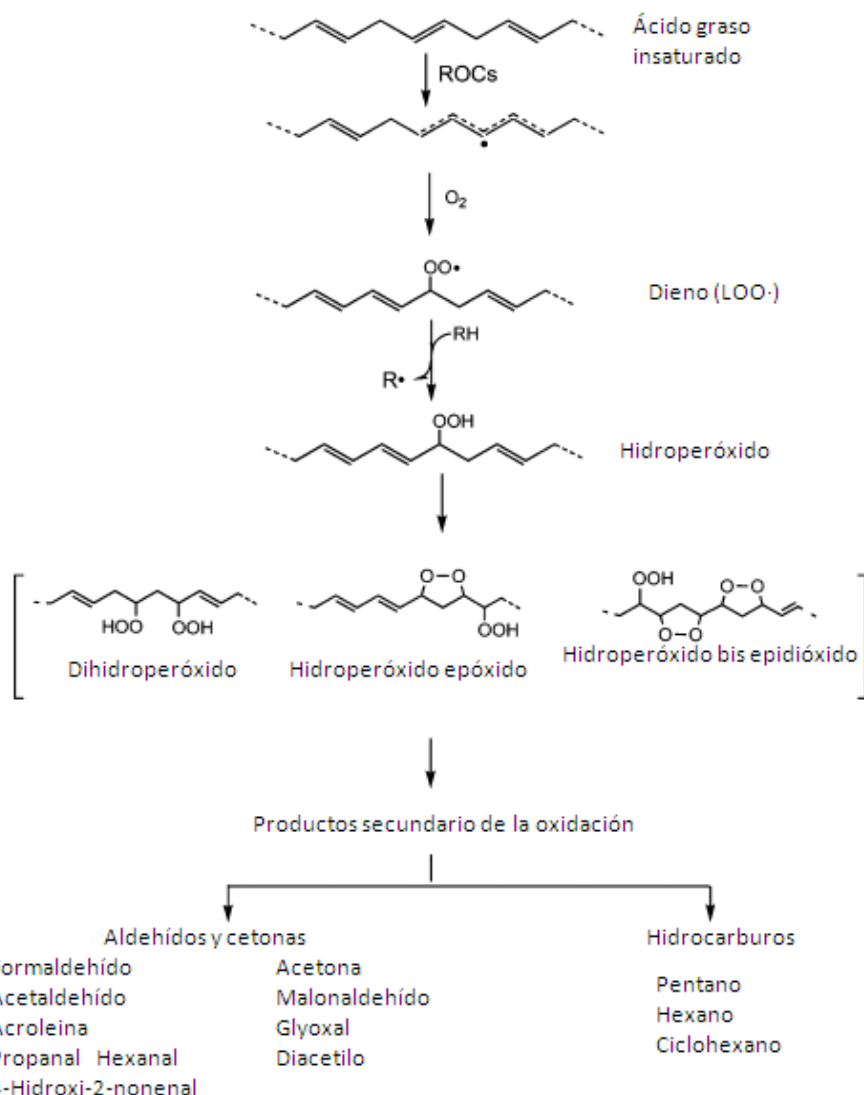


Figura No.18 Diagrama de mecanismo para la peroxidación de dienos conjugados [21]. Para establecer la calidad de una sustancia antioxidante es necesario determinar su actividad acompañado de sustratos oxidables, para tal fin existen diversas metodologías. La clasificación de las metodologías se hace según el carácter biótico o abiótico del medio en el que se realiza la prueba, reportándose como *in vivo* o *in vitro*, respectivamente. Para sistemas abióticos existen varias técnicas: mediante determinación de peróxidos [36], espectrofotométricas dentro del rango visible y también utilizando espectroscopia infrarroja [37] [38] entre otras metodologías.

Los antioxidantes tienen el objetivo de neutralizar a los radicales que actúan como iniciadores del conjunto de reacciones que desencadenan la oxidación. La tarea de un antioxidante se puede realizar principalmente mediante dos mecanismos: (i) transferencia electrónica única (SET) y (ii) transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), abreviadas por sus siglas en inglés. A modo de ejemplo para cada uno de los mecanismos de acción se presentan solamente dos de las posibles técnicas.

Por otra parte, muchos autores determinan el contenido total de fenoles (CTF) dado que estos se correlacionan con la actividad antioxidante.

2.3.8.2.1 Métodos de transferencia electrónica

Por definición cuando una sustancia pierde electrones se oxida y actúa como agente reductor, para este caso, al tener una sustancia que cede electrones, reduce al radical formado y evita que se presente una reacción en cadena. Esta forma de protección se puede evaluar mediante diferentes métodos entre los que se encuentran 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y poder antioxidante por reducción de hierro (FRAP).

2.3.8.2.1.1 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

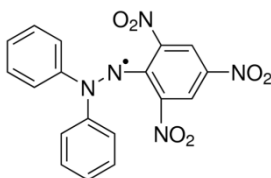


Figura No.19. Estructura del radical DPPH

La determinación de la A.A. por medio del radical DPPH se basa en la reducción del radical al captar electrones desde una molécula que los cede y cumple su función como antioxidante. Se cuantifica midiendo la disminución de absorbancia a 515 nm. Se emplea sobre todo para determinar la eficacia antiradicalaria de compuestos fenólicos. La unidad en la que se reporta la actividad antioxidante es en equivalentes de Trolox (ET), EC_{50} o IC_{50} . Estas dos últimas unidades de medida corresponden a la cantidad de antioxidante necesario para llegar al 50% de extinción de una molécula o inhibir su efecto, respectivamente, comparandose en ambos casos contra un blanco de trabajo.

2.3.8.2.1.2 FRAP (poder oxidante/reducción del hierro).

Mide la capacidad de una muestra para reducir el complejo incoloro tripiridiazina férrica (Fe^{3+} -TPTZ) al complejo azulado tripiridiazina ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ), el segundo complejo presenta absorbancia a 593 nm. El criterio es que a mayor intensidad en el color azul, mayor es la actividad antioxidante de la muestra. Las unidades para cuantificar esta propiedad son los equivalentes respecto al ácido ascórbico, ácido úrico o Trolox.

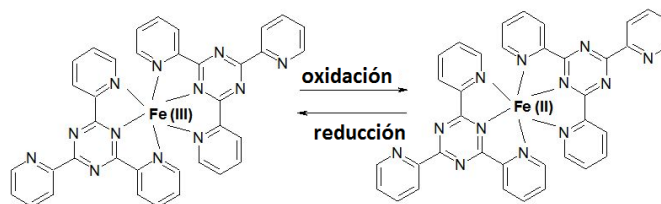


Figura No.20 Estructura del complejo tripiriditriazina (TPZ) de hierro.

Las dos formas del complejo TPZ que se muestran en la figura No.20 son: (i) forma oxidada (izquierda) y forma reducida (derecha).

2.3.8.2.2 Métodos de transferencia de átomos de hidrogeno

En esta categoría se encuentra el método de la decoloración del β -caroteno y el de la capacidad de inhibición del radical peroxilo (ORAC).

2.3.8.2.2.1 Decoloración del β -caroteno

El método de la decoloración del β -caroteno se basa en la pérdida de color (455 nm) en una solución del carotenoide, en presencia de un ácido graso oxidable. Para este caso la persistencia del color indica una buena A.A. La medida se expresa como el porcentaje de inhibición de la decoloración de la solución, comparando contra una solución sin antioxidante.

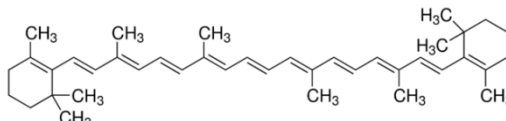


Figura No.21 Estructura de β -caroteno.

2.3.8.2.2.2 ORAC (capacidad de inhibición del radical peroxilo)

Una segunda metodología, en la cual se tiene la transferencia de átomos de hidrogeno, es la capacidad de inhibición del radical peroxilo (ORAC). La cual mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente como la fluoresceína sometida a un flujo constante de radicales peroxilo generados por el azo-iniciador clorhidrato de 2,2'-azobis(amidinopropano), abreviado como AAPH. La protección ejercida por los antioxidantes se cuantifica a través de la fluorescencia. La unidad de comparación de la medida de la actividad antioxidante es el equivalente Trolox (ET).

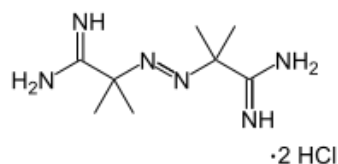


Figura No.22. Estructura del azo-iniciador clorhidrato de 2,2'-azobis(amidinopropano).

2.3.9 Muestras de trabajo

El tamaño de partícula es un factor determinante en el rendimiento. A medida que se reduce el tamaño de partícula aumenta el rendimiento y se reduce el tiempo de extracción [7] [11]. La influencia de reducir el tamaño de partícula podría ser semejante al uso de extracción en condiciones de ultra alta presión [26].

2.3.9.1 Hojas de orégano

Bajo el nombre de orégano se enmarcan más de 60 diferentes especies, que comúnmente, a nivel mundial, se usan como condimento o especia. Dos orígenes distintos se presentan para el orégano: (i) el mediterráneo o europeo, proveniente de dos especies principalmente, *Origanum vulgare* subs. *hirtum* (orégano griego) y *Origanum vulgare* subs. *gracite* (orégano turco). (ii) Orégano de origen mexicano, representado por dos especies: *Lippia graveolens* y *Lippia palmeri*, en respectivo orden de importancia, pertenecientes a la familia *Verbenaceae*. La producción mundial del orégano seco supera las 60 mil toneladas, producido principalmente por India y México, con destino preferencial a Estados Unidos.

El orégano europeo se produce en plantaciones destinadas para este fin, tecnificadas para aumentar la productividad, mientras que en Centro y Suramérica se recolecta primordialmente de forma silvestre. El orégano tiene como ventaja que es una especie fuertemente resistente en suelos con escasa precipitación, lo que lo hace viable para zonas semidesérticas.

Como todas las especies vegetales, tiene composición variable a medida que cambian las condiciones de cultivo y etapas de desarrollo. La muestra sometida a extracción en el presente trabajo coincide con lo reportado por Vasquez [39], dicha autora da como los compuestos fenólicos más significativos, dentro de los aceites esenciales extraídos, el timol y el carvacrol.

2.3.9.2 Semillas de guayaba

La guayaba (*Psidium guajava*) es un fruto con origen puntual indeterminado, pero muchos autores coinciden en que fue América el sitio donde se originó. El Orden Rosales contiene a esta planta, la familia es de las Mirtaseas, y el género *Psidium*. Es amplia la

variedad en este fruto y el cultivo no siempre es originario de la región en la que se produce. Se presentan diferencias físicas significativas, pues el peso puede variar desde los 25 hasta los 500 gramos. La forma cambia desde ovalada hasta aplanada y el color, tanto externo como interno, también cambia.

El clima óptimo para el cultivo de la guayaba es el seco (bajas precipitaciones) y con temperatura entre 14 y 36 °C.

Los países más representativos en cuanto a la producción mundial de guayaba (*Psidium guajava*) son: Puerto Rico, Cuba, Trinidad y Tobago, Brasil, Estados Unidos, Sudáfrica, India, Martinica, España, Argelia y Túnez. Para el caso de Colombia se tienen como representantes del cultivo de esta fruta a los departamentos de: Santander, Boyacá, Atlántico, Antioquia, Valle, Cundinamarca, Caldas, Huila y Magdalena, siendo el primero el que mayor aporte realiza.

La variedad de productos que se elaboran con la pulpa de esta fruta van desde bocadillos, pasando por jalea, jugos, compotas hasta llegar a ser parte de las raciones militares utilizadas en la segunda guerra mundial, entre muchos otros usos.

Con base en la cantidad de hectáreas cultivadas, los departamentos colombianos se clasifican por orden de importancia así: Valle del Cauca (1174 ha), Meta (842 ha), Santander (572 ha), Caldas (456 ha), Quindío (368 ha), Risaralda (221 ha) y otros (938 ha), teniendo un área productiva total de 3819 hectáreas y con un total de área cultivada 4805 hectáreas, para una producción promedio por hectárea de 14,9 ton/ha, donde la sumatoria de la producción en Colombia fue de 56975 toneladas (ENA 2011). El contenido en peso de semillas oscila entre 1,6 y 4,4 %, dejando entonces un residuo que varía entre las 911 y 2507 toneladas. (http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mca/salazar_g_c/capitulo4.pdf).

El contenido de vitamina C (273 mg/100g) en la guayaba supera lo encontrado en la naranja, lo que es un indicativo de su alto valor nutricional, que se ve reforzado al presentar también un contenido significativo de vitaminas de grupo B (0,03 mg de vitamina B1, 0,04 mg de vitamina B2, 1,12 mg de vitamina B3, 0,15 µg de vitamina B5, 0,14 mg de vitamina B6, 14 µg de vitamina B9) y vitamina A (122,2 µg), junto con carbohidratos (5,82 g) entre otros[40].

2.3.9.3 Semillas de papaya

La papaya es un fruto de origen desconocido, pero que se arraiga en las zonas tropicales, ocupando el cuarto lugar por extensión de cultivos junto con la guayaba.

En el caso de la papaya (*Carica papaya L.*) en las variedades Tailandia y Maradol, se obtuvieron para los parámetros físicos los siguientes resultados: peso (1414,17 y 2210,06g), perímetro (39,75 y 38,95cm), longitud (20,16 y 35,25cm), diámetro (12,51 y 12,51cm), cavidad ovárica (7,13 y 6,47cm), grosor del mesocarpio (2,93 y 2,90cm), número de semillas (46 y 231), peso del mesocarpio (1066,75 y 1735,80g) y peso del exocarpio (287,80 y 416,44g), pH (5,47 y 5,24), sólidos solubles en grados Brix (9,47 y 9,14) respectivamente. En el caso de papaya (*Carica papaya L.*) también puede

encontrarse un reporte de la cantidad de semillas entre valores que oscilan desde 800 hasta 1000 unidades por cada fruto [41].

Con base en la cantidad de hectáreas cultivadas, se ordenan los departamentos colombianos así: Córdoba (1765), Antioquia (1693), Valle del Cauca (648), Nariño (348), Cauca (127), Tolima (17) y otros (106), sumando una área productiva total de 4807 hectáreas, con un área total cultivada de 7439 hectáreas. La producción promedio por hectárea es de 25,9 ton, para un total en Colombia de 124444 toneladas (ENA 2011). A pesar del bajo porcentaje en peso que representa la semilla en la papaya se están cultivando variedades de menores contenidos de semilla, lo que es favorable para el consumidor, pero desfavorable para el cultivador, pues, este último tiene que comprar la semilla cada vez que se siembra, puesto que es un cultivo que se propaga por semilla.

2.3.9.4 Epicarpio (cáscara) de mandarina

A nivel mundial China lidera la producción anual de mandarina con 7,5 millones de toneladas al año, destinadas principalmente al consumo interno. En segundo lugar está España con 1,7 millones de toneladas seguido por Japón con 1,1 millones de toneladas. A nivel latinoamericano Brasil se encuentra a la cabeza con 770.000 toneladas y Colombia para el 2004 producía 64.883 toneladas. El rendimiento por hectárea puede llegar hasta aproximadamente 30 toneladas [42]. En Colombia el área dedicada al cultivo de mandarina pasó de 15095 ha en el 2014 a 15891 ha en el 2015, con una respectiva producción 97218 ton y 95405 ton, lo que significó un aumento del 1,0 %. Durante el lapso entre estos dos años fue el cultivo con mayor aumento en cantidad de árboles en edad productiva, seguido por el aguacate, según la Encuesta Nacional Agropecuaria-ENA realizada en el 2015.

Para la variedad Arrayana el espesor del epicarpio en la zona ecuatorial se reporta de 2,6 mm \pm 0,4 y representa el 25% del total de la masa del fruto [43]. El epicarpio de mandarina-EM presenta un alto contenido de carotenoides en comparación con cítricos semejantes [44]. Entre los extractos obtenidos a partir de cáscara de cítricos se presentan grandes diferencias en cuanto al rendimiento, dependiendo de la técnica utilizada, llegando hasta 6,3% para el pomelo (*Citrus máxima*) utilizando un equipo de Soxhlet [45], pasando por 2,6% (*C. reticulata*) por extracción en frío [46], y disminuyendo a 0,3% (*C. reticulata*) mediante arrastre con vapor [47].

3 METODOLOGÍA

En el diseño y la construcción del equipo para la extracción con fluidos a alta presión, se partió de los equipos anteriormente construidos en el grupo de investigación. Se copian algunas partes, otras se modifican, algunas se cambian, se descartan o se fabrican nuevas.

Con el propósito de ensamblar y probar un sistema de extracción para ser usado en EFS, el trabajo se desarrolló en tres etapas: (i) diseño y construcción del equipo, (ii) obtención de extractos desde diferentes biomásas con el equipo desarrollado y (iii) evaluación del rendimiento y la calidad de los extractos obtenidos.

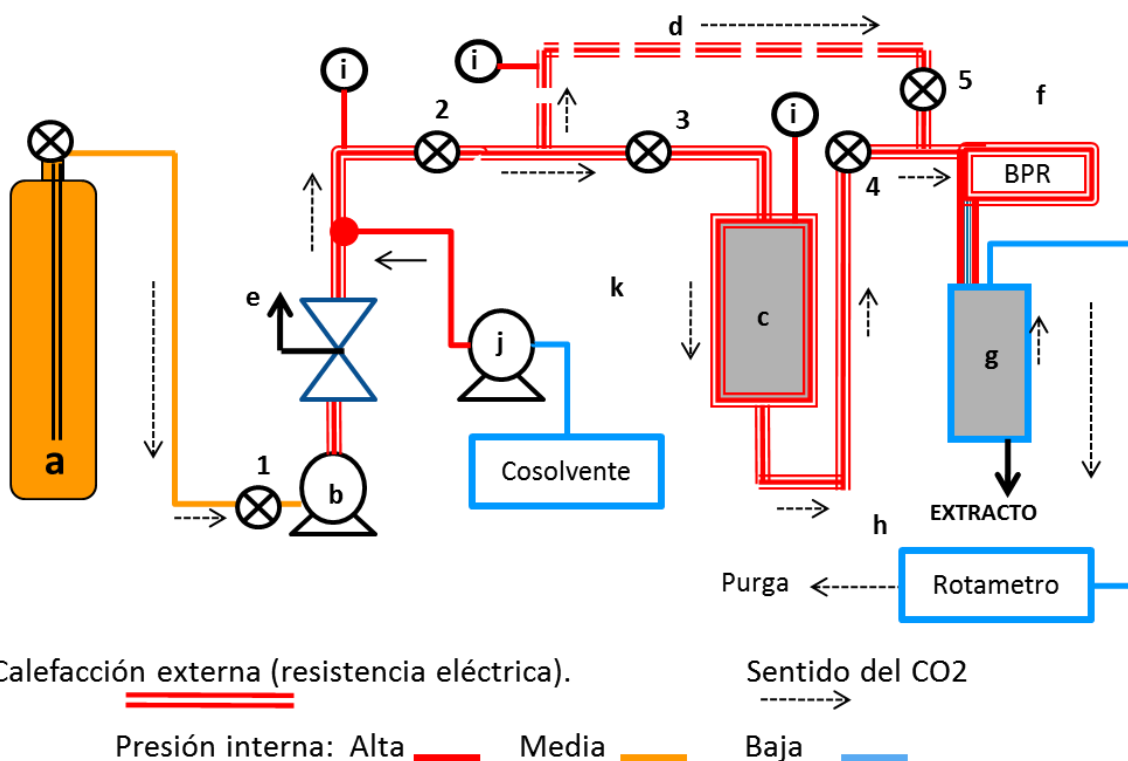


Figura No.23. Esquema del equipo construido para EFS en flujo continuo.

Dentro de la figura No.23 se observa: a) Reservorio de CO₂, b) Bomba principal, c) Cámara de extracción, d) By-pass, e) Válvula de seguridad, f) Válvula reguladora de presión anterior (BPR), g) Sistema de recolección de muestra, h) Rotámetro, i) Manómetros, j) Bomba CLAR (modificador de polaridad opcional), k) Reservorio de modificador de polaridad. 1-5) Válvulas on-off.

3.1 Diseño y construcción de equipo para EFS

El diseño del aparato para extracción con fluidos supercríticos en flujo continuo (EFSFC) se proyectó con una resistencia mecánica superior a las condiciones de trabajo, especialmente en el reactor, con el fin de minimizar la posibilidad de falla por explosión.

Debido a la dilatación y contracción por cambios de temperatura se proyectó un margen de tolerancia entre el 5 y 10%, usando curvas que asimilen dichos cambios en las dimensiones de las piezas, minimizando con ello la posibilidad de fugas. En el caso de la tubería, se logró dicha tolerancia al dejar curvas que amortigüen las variaciones. Por el mismo motivo en la cámara de extracción se disponen las líneas de alimentación y de salida en forma no colineal, con ingreso lateral.

Por otra parte, la homogeneidad superficial de las piezas fabricadas es importante. Al maquinar las piezas es necesario evitar crear marcas o entalles que actúen como concentradores de esfuerzos. Los lugares en donde el material no es homogéneo funcionan como punto de inicio para falla por fatiga. Las imperfecciones del material pueden originarse por calentamientos puntuales, durante el maquinado o el funcionamiento, generando un cambio de fase en el mismo. Para evitar lo anterior las piezas fueron maquinadas a baja velocidad con líquido lubricante.

3.1.1 Reservorio de disolvente y modificador

Se optó por un cilindro con capacidad de 20 Kg, que posee tubo de inmersión, para el CO₂. El seguimiento de la cantidad de CO₂ restante en el cilindro, se realizó mediante el peso con una balanza digital de $\pm 0,1$ kg, pero para determinar la cantidad de CO₂ que fluye a través del sistema se usó un rotámetro. El seguimiento de la cantidad restante de CO₂ dentro del cilindro, no puede hacerse con base en la presión, ya que solo cuando se termina el líquido empieza a reducirse la presión, antes de ello se está trabajando en el punto de equilibrio líquido-gas.

La premezcla de CO₂ y modificador en el cilindro es una posibilidad, para la cual se recomienda usar filtros con tamaño de poro entre 5 y 10 micras, situado a la salida del cilindro, con el fin de retirar posibles contaminantes. Para estas premezclas también se sugiere usar cilindros de aluminio. La salida del cilindro debe ser limpiada al cambiar el cilindro, abriendo suavemente el flujo varias veces hasta que, por el enfriamiento debido a la rápida descompresión, se presente formación de CO₂ sólido. El filtro a la salida del cilindro se debe cambiar cada vez que se reemplace dicho cilindro con disolvente.

Luego del cilindro se dejó un serpentín en tubing de 1/4" con el fin de tener la posibilidad de enfriar el CO₂ en un baño frío, que permite evitar la evaporación del líquido antes de llegar a la bomba [14] [16] [23] [35]. El uso de dicho enfriamiento se recomienda para el equipo construido solo en caso de trabajar con reactores de mayor volumen, ya que para la presente cámara de extracción, la alta capacidad de la bomba puede presurizar rápidamente el sistema con CO₂, aunque venga en forma gaseosa.

3.1.2 Tubing y uniones

Los ductos y uniones para el ensamble del equipo deben tener una presión máxima superior a la presión de trabajo (345 bar). Respecto al ducto que comunica el cilindro de CO_2 con la bomba, tiene un diámetro de $\frac{1}{4}$ " para evitar la caída de presión y a su vez reducir las pulsaciones. Sin embargo, un diámetro muy elevado, en el ducto antes mencionado, aumentaría el volumen muerto y también los costos por extracción.

Antes de instalar el tubing se lavó con ácido nítrico de concentración 6 molar (6 M), luego con agua y por último se secó en horno (2 h, 120°C). Las uniones son metálicas y el sellado se realiza mediante férulas con anillo, que también se elaboran en acero inoxidable 316. El tubing con costura no se usa, por presentar menor resistencia mecánica y mayor probabilidad de falla en la zona de la soldadura.

Para curvar el tubing se usó un doblador de tubo, con el fin de evitar curvas muy cerradas, minimizando el riesgo de colapsos que actúan como restrictores. Curvas demasiado cerradas crean zonas con menor resistencia mecánica. También al existir curvas cerradas, en caso de que viajen partículas sólidas en la parte interna, estas podrían golpear la tubería, e incrustarse, corroer o erosionar la superficie interna. Los cortes de tubing se hicieron con cortatubos de rodaja en ángulo de 90° , respecto a la dirección del flujo dentro, y para tubing con diámetro de $\frac{1}{16}$ de pulgada, se corta con electro-abrasión para evitar que el tubing se deforme o quede sellado.

3.1.3 Sistema propulsor del disolvente

Para el equipo de EFS diseñado se opta por una bomba de diafragma, debido a que no contamina el CO_2 con lubricante, figura No.24. La línea punteada en el esquema representa la membrana metálica.

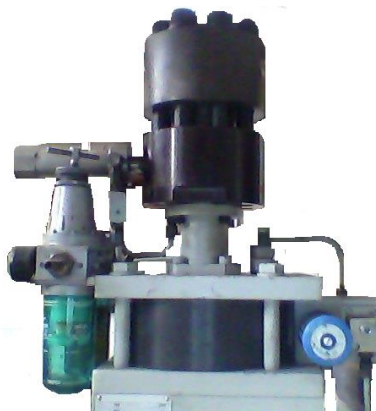
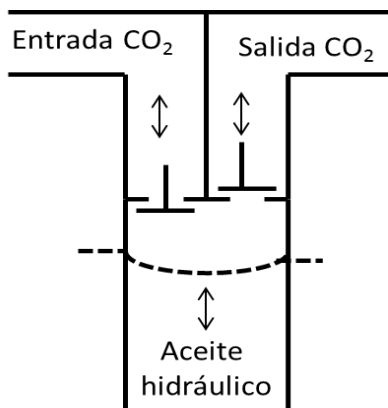


Figura No.24 Bomba de membrana metálica con doble cheque e impulsión por medio de aceite hidráulico.

La bomba usada en este trabajo puede suministrar un flujo superior al requerido, permitiendo aumentar la escala del equipo. A medida que aumenta la escala del equipo

se reducen el costo del producto [15]. También al tener sobre dimensionada la bomba da la versatilidad para trabajar con varios reactores en paralelo.

En la bomba utilizada, la presencia de un orificio de inspección (figura No.25) permite determinar la integridad del diafragma, ya que si sale aceite hidráulico o CO_2 , es indicativo de un daño en la membrana. Comúnmente no debe presentarse ninguna fuga por el orificio de control.

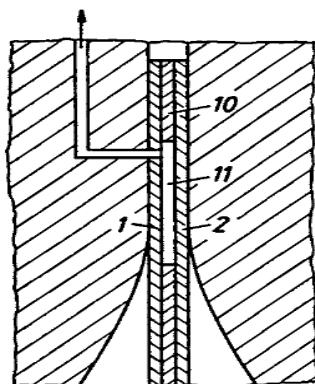


Figura No.25 Corte lateral de orificio de inspección para bomba de membrana metálica. [18].

Dentro de la figura No.25 se presenta: 1) Lamina que limita con el fluido bombeado, 2) Lamina que limita con el aceite hidráulico, 10) Separador y 11) Zona libre del paso de fluidos.

3.1.4 Sistema propulsor del modificador

Se eligió el uso de una bomba secundaria tipo cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), para el suministro del modificador de polaridad, teniendo en cuenta que el etanol (EtOH) se encuentra en estado líquido a condiciones ambientales. Al usar una bomba con dos pistones reciprocantes se minimizan las pulsaciones en el suministro, como se aclaró anteriormente. Las especificaciones de trabajo para la bomba son: flujo máximo de 9,9 y mínimo de 0,1 mL / min. con una presión máxima de trabajo de 5000 psi. En trabajos anteriores, del grupo, se usaron diferentes sistemas para adicionar el modificador de polaridad, pero se presentan ciertos inconvenientes como: (i) al suministrar el modificador por el paso del CO_2 en un saturador, se arrastra una cantidad inexacta de modificador [21], (ii) Otra forma usada para suministrar el modificador de polaridad fue la adición directa en la cámara de extracción antes de sellarla, con los inconvenientes de evaporación mientras se cierra la cámara, cambio en la cantidad de

modificador por acumulación o pérdida al hacer varios baches de una misma muestra [39]. Para este trabajo, se corroboró la calibración de la bomba CLAR (Figura No.26), al hacer seguimiento de la cantidad adicionada, colocando el modificador de polaridad en una probeta graduada y midiendo el consumo en función del tiempo.



Figura No.26 Bomba de pistones recíprocentes usada para suministrar modificador (EtOH).

Para minimizar la evaporación del modificador, la probeta que lo contiene se cubrió con papel aluminio.

3.1.5 Cámara de extracción

Para el aparato fabricado se usó una cámara de extracción con entrada y salida de fase extractante en la parte lateral, dejando libre la parte superior para el cambio de la muestra y usando un sistema de sello sin rosca. Lo anterior permite la apertura y cierre del reactor sin desconectar ni la entrada ni la salida, Figura No.27.

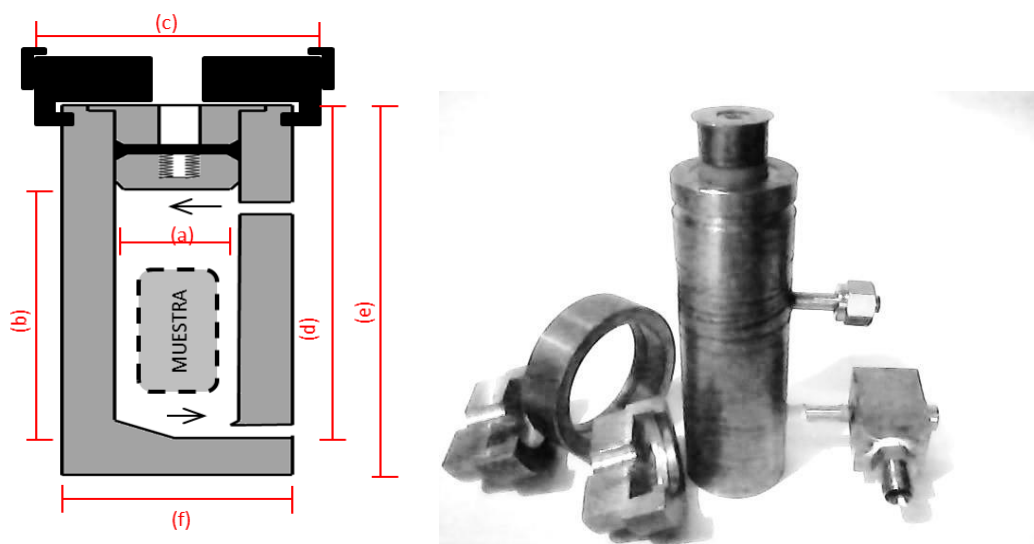


Figura No.27 Cámara de extracción usada en el equipo construido para EFS.

Las convenciones de la Figura No.27 son: (a) diámetro interno de la cámara, (b) altura interna de la cámara, (c) diámetro de tapa seccionada, (d) Altura del orificio interno del reactor, (e) altura total del reactor, (f) diámetro externo del reactor. El diámetro del orificio de entrada y salida es de $\frac{1}{4}$ " (6,35 mm).

Con el propósito de obtener una cantidad adecuada de muestra y conociendo las matrices a trabajar (HO, SG, SP y EM), junto con los reportes de rendimiento para estas matrices, se considera que un volumen interno aproximado de 50 mL es adecuado para la cámara de extracción del aparato fabricado. El ducto lateral superior se eligió como la salida de la fase extractante, con la ventaja de tener un lecho fluidizado a la entrada inferior.

3.1.6 Flujo dentro de la cámara de extracción

Con base en la fórmula para el numero de Reynols (Ecuación No.1) establecemos cual es el valor para dicho número, con el fin de determinar el régimen para el comportamiento del fluido, el cual se usa como disolvente en las extracciones realizadas mediante EFS.

$$Nre = \frac{\text{fuerzas inerciales}}{\text{Fuerzas viscosas}} = \frac{\rho DV}{\eta} \quad \text{Ecuación No.1 = Número de Reynols}$$

El presente trabajo se desarrolló con un flujo de $25 \text{ g CO}_2 / \text{h} * \text{g}_{\text{muestra}}$, lo que corresponde a un numero de Reynolds aproximadamente de 183, bajo las condiciones de 150 bar, 70°C y tubing de $\frac{1}{4}$ " calibre 18 (0,049"). Debido al bajo número de Reynolds, mediante la inserción de un segmento de tubing de $\frac{1}{8}$ " en la parte interna de del tubing de $\frac{1}{4}$ ", a la entrada, se reduce el diámetro a la mitad para cuadruplicar el número de Reynols, que junto con la entrada y salida del fluido en forma lateral a la cámara de extracción, mejoran la turbulencia.

Para corroborar mediante modelado computacional que los cambios propuestos favorecen la turbulencia y reducen las zonas sin flujo, se realizó el modelado que se muestra en la Figura No.28, mediante el programa Solid Works. En el caso Figura No.28 (A) se tiene entrada por el centro de la base y salida por el centro de la tapa, con tubing de $\frac{1}{4}$ ", obteniendo unas trayectorias, del flujo, casi lineales entre la entrada y la salida. Con el cambio de la entrada y la salida en forma lateral (Figura No.28 (B)), y conservando el diámetro de la tubería en $\frac{1}{4}$ ", mejora la turbulencia y se reducen las zonas no alcanzadas por las partículas, cuyas trayectorias son modeladas. Finalmente en la Figura No.28 (C) se muestran las trayectorias de las partículas cuando se disminuyó el diámetro interno de la entrada deste $\frac{1}{4}$ hasta $\frac{1}{8}$ de pulgada, logrando aumentar las velocidades y la turbulencia con la consiguiente reducción de zonas sin intercambio de fluido.

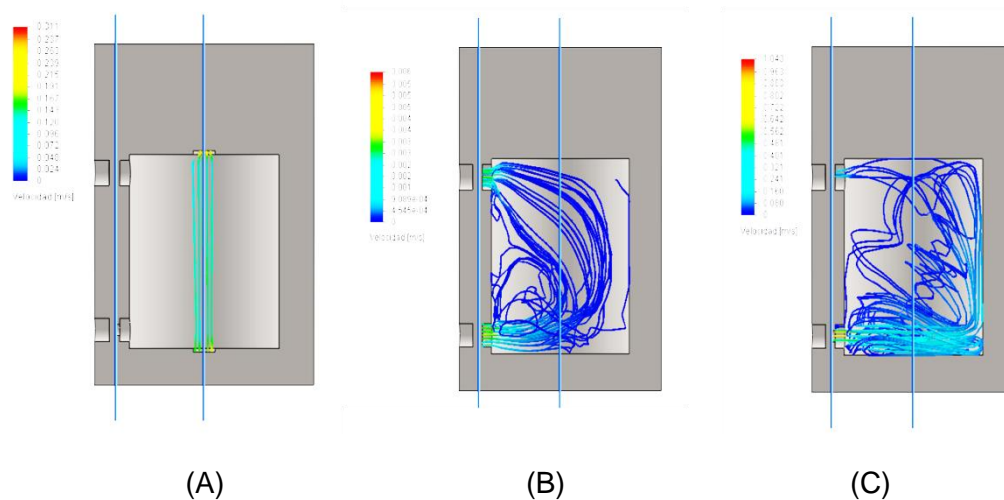


Figura No.28 Modelamiento de los cambios en el flujo dentro del reactor por cambios en la entrada y salida del reactor.

3.1.7 Entrada y salida de la cámara de extracción.

La entrada y salida de fluido en la cámara de extracción, para el aparato fabricado, son intercambiables con el propósito de adaptarlo a las necesidades de cada caso, pero para las extracciones realizadas en el presente trabajo se tomó la decisión de hacer el ingreso del CO_2 , con o sin modificador de polaridad, por la parte inferior (Figura No.29 (b)), pero para minimizar la posibilidad de taponamiento por acumulación de sólidos a la salida de la cámara de extracción, la muestra se coloca dentro un dedal fabricado con papel filtro o tamiz de acero inoxidable, quedando inmovilizada dicha muestra. El dedal de papel filtro también evita el uso de fritas, las cuales pueden favorecer una contaminación cruzada.

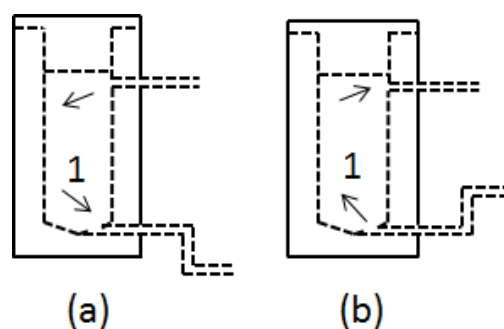


Figura No.29 Dirección de flujo en la cámara de extracción. (a) Descendente y (b) ascendente.

Al tener una matriz líquida, como fuente del extracto obtenido mediante EFS con CO_2 como disolvente, en el reactor fabricado se debe evitar que la matriz líquida fluya hacia un fuera del reactor, por lo que se sugiere que la entrada de disolvente sea por la parte inferior, ya que si el disolvente tiene menor densidad que la matriz líquida, el fluido

supercrítico asciende, retirando los analitos solubles, sin pérdida de la matriz por arrastre mecánico. Una ventaja al configurar la entrada superior y salida inferior, según se muestra en la Figura No.29 (a), es que aquellos líquidos poco volátiles y de baja solubilidad en el fluido supercrítico se retiran por arrastre mecánico, como es el caso del agua en matrices con alto contenido de la misma.

3.1.8 Sellado de la cámara de extracción

Para la cámara de extracción del aparato construido se tiene un empaque, que se encuentra dentro de la tapa, de color negro en la Figura No.27. La presión interna ejercida por el fluido supercrítico aporta a la fuerza necesaria para el sellado entre las superficies del Teflón y del reactor metálico.

3.1.9 Terminado superficial de la cámara de extracción

La cámara de extracción del aparato fabricado no fue sometida a ninguno de los procedimientos que se mostraron en la figura No.15, por lo que se espera un comportamiento tipo D, como el mostrado en la figura citada. En caso de ser necesario extender el tiempo de vida útil para la cámara de extracción, se recomienda realizar el procedimiento de autoenzunchado, con lo cual se obtiene un comportamiento como el que se observa en la tendencia A de la figura No.15.

3.1.10 Agitación en la cámara de extracción

En el equipo construido al reducir de 1/4 a 1/8" el diámetro del orificio de entrada, para el flujo hacia la cámara de extracción, aumenta la velocidad del fluido permitiendo que la turbulencia actué como agitación, elevando el número de Reynols desde 183 hasta 732 sin agitadores mecánicos.

3.1.11 Mezclador de disolvente y modificador

Al tener disolvente y modificador de polaridad, se requiere homogenizar dicha mezcla antes de entrar en contacto con la matriz vegetal en la cámara de extracción, para lograr esto se usó un mezclador estático con corrientes encontradas frontalmente entre el disolvente y del modificador (Figura No.30), lo cual ayuda a generar mayor turbulencia que favorece el mezclado.

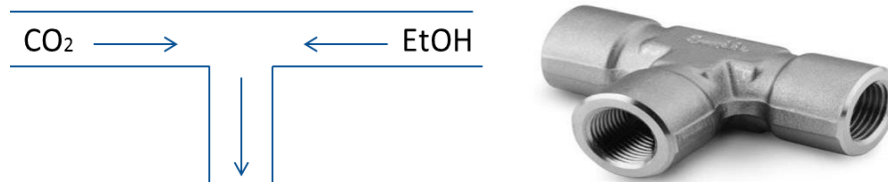


Figura No.30. Mezclador de disolvente y modificador de polaridad.

3.1.12 Calentamiento

Lo expuesto en la parte teórica del calentamiento obligó a realizar un calentamiento con resistencias, calculando que cada segmento disipe en promedio 315 W. Se usó alambre de Cantal con una resistencia de 9,5 Ω /m, con funda siliconada para alta temperatura de 1/8" de diámetro, aproximadamente se tiene una resistencia de 40 Ω para cada segmento. El uso de varios segmentos da la versatilidad de combinar las resistencias en serie o paralelo según sea necesario, como se reporta para el equipo comercial Autoclave Engineers, de origen Estadounidense [14]. Para evitar la pérdida de calor hacia el ambiente se recubre con riata de 1" como aislante térmico.

La versatilidad por tener distintas zonas de calentamiento (tabla No.5), genera la posibilidad de hacer distintas combinaciones en cuanto a condiciones de trabajo. Así mismo, se usaron termocuplas tipo K de pequeño tamaño, con lo que aparte de reducir costos minimiza el tiempo de respuesta del controlador.

Tabla No.5 Resistencias del sistema de calentamiento para el aparato de EFSFC

No.	Ubicación	Ω
1	Reactor-Válvula de seguridad	33,6
2	Válvula de seguridad mezclador	25,9
3	Mezclador	85
4	Meclador-By pass	24,8
5	Primera parte del By pass	23
6	Parte final del By-pass	27,2
7	Cámara de extracción	41,5
8	Cheque - válvula de venteo	42,1
9	BPR	41,8

El aparato fabricado es de ciclo abierto, por lo que no se recupera el CO₂ y por ende no se requiere zona de refrigeración.

3.1.13 Válvulas

3.1.14 Válvulas cheque

Para evitar el daño en los empaques fabricados con elastómero, que se deforman permanentemente por descompresión, se optó por válvulas de cheque con sello metal-metal Figura No.31.



Figura No.31 Válvula cheque en acero para alta presión.

3.1.14.1 Válvulas on-off

Se usaron válvula on-off en los lugares donde no es necesario el control de flujo. Al inicio y final del by-pass se usan válvula de tres vías mientras que en el resto del aparato hay únicamente válvulas de dos vías Figura No.32. Las válvulas son recuperadas de montajes anteriores o equipos con funciones distintas a la EFS.



Figura No.32 Válvula on-off para alta presión

3.1.14.2 Válvula de seguridad

En el aparato fabricado se usó una válvula de resorte (Figura No.33), debido a que no es necesario cambiarla cada vez que se active. Se calibró para su apertura a una presión de 344,7 bar (5000 psi). Sin embargo se evita llegar a condiciones cercanas, manteniendo el régimen de trabajo por debajo de este valor.



Figura No.33 Válvula de seguridad para alta presión con resorte.

3.1.14.3 Válvula de regulación de presión anterior (BPR)

Para el presente trabajo se eligió el uso de una BPR para regular la presión interna del equipo, que aunque tiene un alto costo, estaba disponible (Figura No.34). La prueba inicial de una BPR se realiza con una apertura total seguida de la activación de la bomba de disolvente. Posteriormente se cierra lentamente la válvula hasta verificar el control, procedimiento que evita daños por sobrepresión.



Figura No.34 Válvula de regulación de presión anterior (BPR)

3.1.15 Sistema colector de extracto

Para el aparato fabricado se toma la opción de separar por descompresión en un recipiente que se nombra como separador (Figura No.35). La pérdida repentina de presión hace que el CO_2 pase a estado sólido al reducirse drásticamente la temperatura, originando riesgo de erosión por CO_2 sólido. Para evitar la formación de CO_2 sólido, se debe abrir suavemente la válvula y cerrarla periódicamente, ya que el agua del medioambiente se condensa y solidifica, trabando la válvula. En el caso de trabajar con modificador de polaridad, como lo es el etanol, este estará mezclado con el extracto y por ende, debe ser retirado posteriormente. Para este caso se retira el etanol (EtOH) empleando un rotavaporador, para evitar daños en la muestra, considerando que se busca determinar la calidad de nuestros extractos por medio de la actividad antioxidante. Finalmente para garantizar haber retirado completamente el etanol de los extractos (SG y SP) se liofilizan luego de salir del rotavaporador.



Figura No.35 Separador de extracto y CO_2

3.1.16 Medidor de flujo

Después de sufrir la descompresión dentro del recipiente separador, la salida del CO_2 gaseoso se envía hacia un rotámetro (Figura No.36), que permite evaluar la cantidad de CO_2 real adicionado. En este punto el CO_2 arrastra consigo las sustancias con alta presión de vapor, por lo que queda abierta la posibilidad de colocar posteriormente una trampa criogénica [34].



Figura No.36 Rotametro para de CO₂

3.1.17 Limpieza y calibración del equipo

En la figura No.29 se resalta el desvío (by pass) que permite, para el aparato fabricado, calibrar sin realizar el paso por la cámara de extracción. El by pass puede inferirse de algunos diagramas publicados aunque no se describan sus ventajas y usos [12] [18] [25].

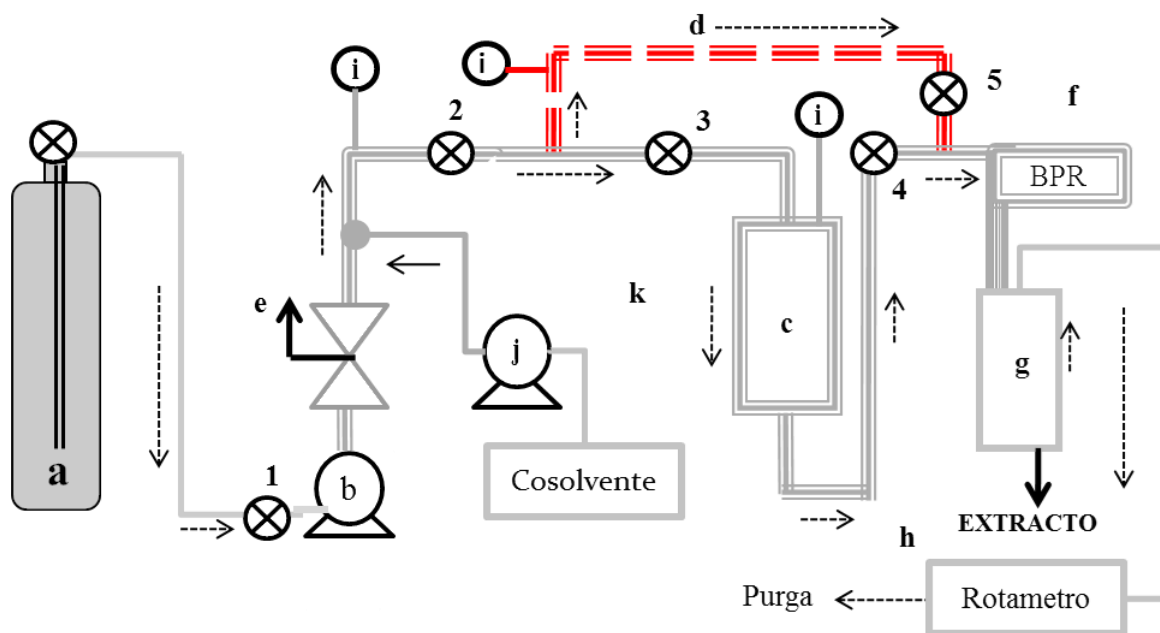


Figura No.37. Esquema del By Pass en el equipo.

Para una limpieza se hace pasar mezcla extractante por el by-pass, lo que permite acortar camino y evitar la zona de la cámara de extracción, disminuyendo la cantidad de

disolvente usado antes y después de cada extracción. Este by-pass también es de utilidad para calibrar el rotámetro en la salida del equipo a las condiciones de trabajo, pero sin estar realizando extracción.

3.2 Obtención de extractos a partir de matrices vegetales

Una vez diseñado y ensamblado el sistema de extracción, éste se empleó para obtener extractos desde diferentes fuentes vegetales, a saber: HO, SG, SP y EM. La balanza con la que se toma el peso de las muestras tiene una sensibilidad de 0,1 mg.

3.2.1 Preparación de muestra

3.2.1.1 Hojas de orégano

Las hojas de orégano-HO (*Lippia origanoides*), provienen de cultivos silvestres ubicados en el Alto Patía colombiano, acorde con lo reportado [39]. El diagrama de flujo que muestra los pasos a seguir en la obtención del extracto para HO, se muestra en la Figura No.38.

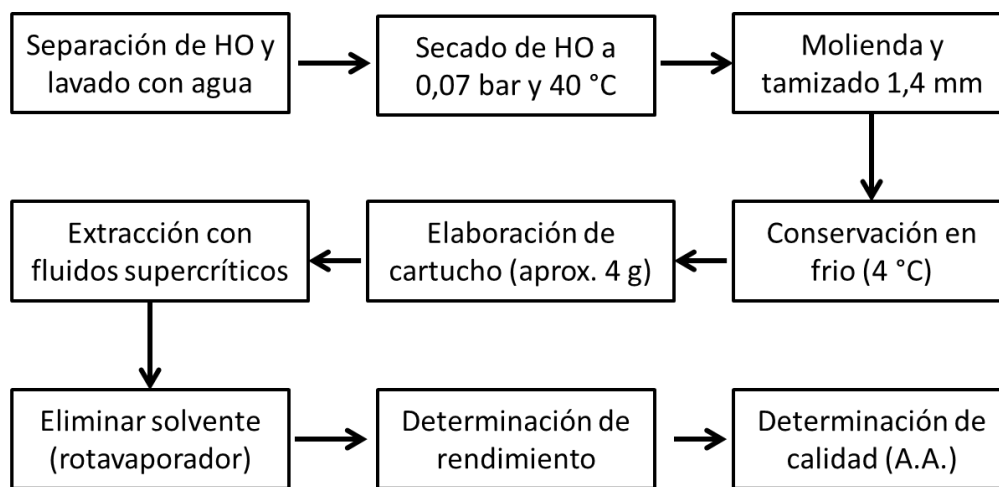


Figura No.38. Procedimiento para extracción de las hojas de orégano-HO (*Lippia origanoides*) mediante EFS.

El secado a presión reducida es aconsejable para disminuir el daño a las sustancias con A.A. [48], pero no se debe exceder, puesto que se perderían los compuestos volátiles. El extracto no se sometió a liofilización ya que se buscaba obtener la fracción volátil de las HO.

3.2.1.2 Semillas de guayaba y semillas de papaya

Las semillas de guayaba-SG (*Psidium guajava*) y las semillas de papaya-SP (*Carica papaya*), fueron sometidas a un mismo procedimiento para obtener los extractos, como se muestra en la Figura No.39.

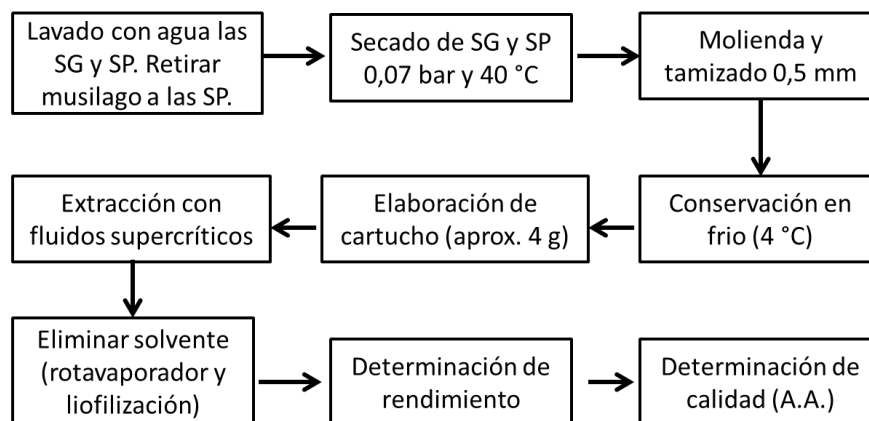


Figura No.39 Procedimiento para obtener extractos de las semillas de guayaba- SG (*Psidium guajava*), y semillas de papaya-SP (*Carica papaya*) con EFS.

Finalmente, en los ensayos en los cuales se utilizó modificador se realizó un proceso de concentración mediante rotaevaporación y los extractos SG y SP, se liofilizaron, mientras que para EM se realizó una destilación simple rápida.

Para elaborar los portamuestras, o dedales, se usó papel filtro. El volumen de muestra destinado para la EFS, entre las figuras No.30 y No.31, cambia debido a que las SG y SP poseen una densidad superior a las HO. También se consideró la relación entre el volumen de la cámara respecto a la masa de muestra, entre las relaciones reportadas están 2,5 [31], 3,3 [31], 3,75 [29], 4 [11], hasta 10,4 [23] mL _{cámara} / g _{muestra}, siendo lo más común 5 mL _{cámara} / g _{muestra} [16],[27], [29], [30]. Al utilizar los cartuchos de papel para contener la muestra, se logra evitar la contaminación cruzada por un deficiente lavado cuando se usan fritas en acero.

3.2.1.3 Epicarpio de mandarina

El epicarpio de mandarina-EM (*Citrus reticulata*) se trabajó en fresco, con un tamaño de partícula de 1 cm², aproximadamente. Con el fin de seleccionar la variedad de mandarina con mejor posibilidad para ser llevada a EFS se realizaron ensayos previos para determinar el rendimiento de extracción, mediante las técnicas de arrastre con vapor (AV) tomando 180 g y Soxhlet (SH) usando 35 g, a partir de los epicarpios de dos variedades de mandarina (var. *comun* y var. *clementina*). La variedad común se caracteriza por tener un epicarpio delgado y liso, y la variedad *clementina* presenta un epicarpio grueso y rugoso. En la figura No.40 se muestra el respectivo procedimiento. Las condiciones de extracción fueron: (i) Arrastre con vapor (AV) realizado durante 150 min con potencia de calentamiento 650 W, sobre una muestra de 180 g, (ii) Soxhlet con mezcla de hexanos

durante 90 min. con potencia de calentamiento 430 W, obteniendo 6 ciclos de extracción (6 sifones), con una muestra de 35 g.

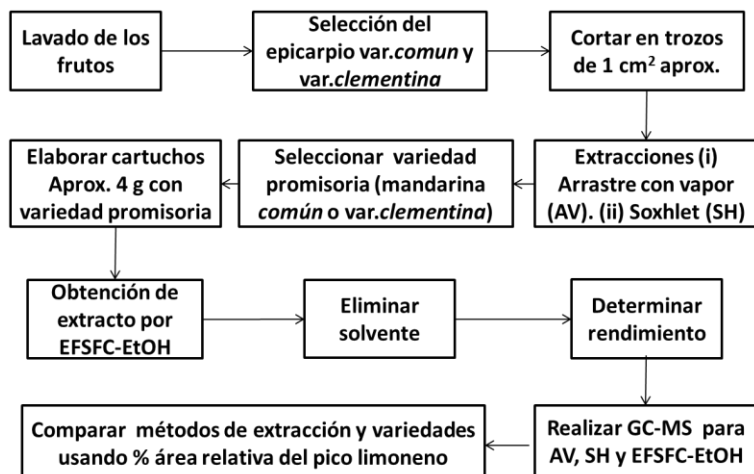


Figura No.40. Procedimiento para obtener extractos de epicarpio de mandarina-EM (*Citrus reticulata*).

3.2.2 Métodos usados para EFS

Dada la versatilidad del equipo construido fue posible realizar con él cuatro tratamientos distintos: (i) extracción con CO₂ supercrítico en flujo discontinuo sin modificador de polaridad (EFS), (ii) extracción con CO₂ supercrítico en flujo discontinuo (EFS) con etanol (EtOH) como modificador de polaridad (EFS-EtOH), (iii) extracción con CO₂ supercrítico en flujo continuo sin modificador de polaridad (EFSFC) y (iv) extracción con CO₂ supercrítico en flujo continuo con etanol (EtOH) como modificador de polaridad (EFSFC-EtOH). El cambio entre continuo y discontinuo se logró al regular el flujo con la BPR o usarla como una válvula on-off, respectivamente. La diferencia entre trabajar con o sin modificador de polaridad implicó el suministro o no de etanol, con una segunda bomba de dos pistones recíprocos, tipo CLAR. Las condiciones de trabajo para cada uno de las extracciones se muestran en la tabla No 6. En el caso del EM se proponen unas condiciones diferentes a las reportadas en la literatura [47] para EFS, con el fin de comparar dos métodos: uno sin modificador en otro equipo, y otro método con modificador (EtOH 10%) en el equipo construido.

Los valores para las variables se basan en trabajos previos, lo cual permitió comparar los extractos obtenidos con diferentes aparatos a las condiciones que se muestran en la tabla No.6. Dentro de dicha tabla, las columnas indican el cambio de matriz, mientras que las filas corresponden a cambios en el método de extracción, de acuerdo a las convenciones antes mencionadas. Para el caso de HO la extracción en discontinuo se orienta por Vasquez [39] y en el caso de flujo continuo se referencian en Caverio [49]. Los extractos de SG tienen de referente a Castro [19] para EFS y EFS-EtOH. En SG para los

métodos de EFSFC y EFSFC-EtOH se orienta por Norshazila [22]. Para SP se basa en lo reportado por Castro [50] y Maisarah [51], para discontinuo y con flujo continuo, respectivamente. Finalmente al trabajar con EM en EFSFC-EtOH se basa en lo reportado en literatura por Ram [52], pero reduciendo el tiempo de extracción a 20 min y cambiando las condiciones al modo con adición de modificador, etanol (EtOH-10%). La zona de calentamiento del equipo disipa 240 W.

Tabla No.6. Condiciones de presión, temperatura, tiempo y cantidad de modificador, para la EFS con CO₂ en las matrices de HO, SG, SP y EM.

CONDICIONES EXPERIMENTALES				
Metódo de extracción	Hojas de oregano HO	Semillas de Guayaba SG	Semillas de papaya SP	Epicarpio de mandarina EM
EFS	110 bar, 50 °C, 90 min (seis etapas de 15 min)	110 bar, 50 °C, 30 min	200 bar, 50 °C, 180 min	-
EFS-EtOH	110 bar, 50 °C, 90 min (seis etapas de 15 min), 7 %EtOH	110 bar, 50 °C, 30 min, 10 %EtOH	200 bar, 50 °C, 180 min, 8 %EtOH	-
EFSFC	150 bar, 40 °C, 50 min, 25 g CO ₂ / h * g muestra	110 bar, 50 °C, 240 min, 25 g CO ₂ / h * g muestra	200 bar, 50 °C, 420 min, 25 g CO ₂ / h * g muestra	-
EFSFC-EtOH	150 bar, 40 °C, 50 min, 7 %EtOH, 25 g CO ₂ / h * g muestra	110 bar, 50 °C, 240 min, 10 %EtOH, 25 g CO ₂ / h * g muestra	200 bar, 50 °C, 420 min, 8 %EtOH, 25 g CO ₂ / h * g muestra	300 bar, 35 °C, 20 min, 10 %EtOH, 25 g CO ₂ / h * g muestra

Aunque las condiciones no son las mismas entre matrices (HO, SG, SP y EM), las comparaciones se realizaron al considerar que dichas condiciones dieron los mejores resultados en los reportes de otros autores.

3.2.3 Evaluación del rendimiento y la calidad de los extractos

3.2.3.1 Rendimiento

Para el rendimiento de los extractos obtenidos se toma como parámetro la muestra en base seca, dando el resultado como porcentaje en masa. El análisis estadístico se lleva a cabo por ANOVA de triplicados. Para realizar el análisis los datos se agruparon de distintas formas: (i) matriz de trabajo, (ii) método de extracción y (iii) unidades en la que se reportan los datos. Cuando no hay posibilidad de tener los datos originales para un valor reportado en la literatura, el análisis se hace por comparación entre promedios.

Los extractos obtenidos con modificador de polaridad fueron sometidos a rotavapor y liofilización, según el caso; posteriormente se pesaron, con lo cual se determinó el rendimiento en extracto, ver ecuación 2.

$$\% R = \frac{m_{ext}}{m_{ms}} \times 100\% \quad \text{Ecuación No.2 = Porcentaje de rendimiento}$$

Donde: % R = % Rendimiento.

m_{ext} = masa del extracto obtenido.

m_{ms} = masa de la muestra seca.

Antes de realizar la EFS del epicarpio de mandarina se evaluó el rendimiento en las técnicas de arrastre con vapor (AV) y Soxhlet (SH) en dos variedades distintas: *mandarina var. común* (cascara lisa y delgada) y *mandarina var. clementina* (cascara gruesa y rugosa). Con base en los resultados más altos para la *mandarina var. clementina*, ésta se sometió a extracción con fluidos supercríticos en flujo continuo usando etanol como modificador (EFSFC-EtOH), ver Tabla No.7.

Tabla No.7. Rendimiento de los ensayos preliminares (AV y SH) para epicarpio de mandarina *var.común* y *var.clementina*.

Técnica y matriz	% rendimiento
Arrastre con vapor epicarpio de <i>mandarina var. común</i>	0,15
Soxhlet epicarpio de <i>mandarina var. común</i>	3,95
Arrastre con vapor epicarpio de <i>mandarina var. Clementina</i>	0,19
Soxhlet epicarpio de <i>mandarina var. clementina</i>	6,99

3.2.3.2 Calidad

El parámetro con el cual fue determinada la calidad de los extractos (HO, SG y SP) es la actividad antioxidante (A.A). Uno de los usos que se ha dado a los extractos con A.A. obtenidos por diferentes métodos, desde fuentes vegetales, es su adición a productos alimenticios, como agentes inhibidores de la oxidación. Un ejemplo de ello, es el caso de los aceites comestibles, en donde se adicionan antioxidantes, con el fin de evitar su degradación oxidativa [2], [21]. Las pruebas de A.A. a las que se sometieron los extractos fueron (i) Radical DPPH y (ii) decoloración del β -caroteno. Por su parte los extractos de epicarpio de mandarina (EM) fueron analizados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, abreviada como GC-MS por sus siglas en ingles.

3.2.3.2.1 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Al realizar las pruebas de actividad antioxidante mediante el método del radical DPPH el procedimiento fue: se preparó una solución de DPPH 0,1 mM en etanol con absorbancia de 1,100 U_{abs} . 975 μ L fueron incubados por 7 min, se leyó la Absorbancia a 515 nm y luego de adicionar 25 μ L de extracto o patrón, se midió cada 10 min (T=amb) durante 2 h.

$$(\%) DPPH = \frac{(A_{blanco} - A_{muestra})}{A_{blanco}} \times 100\% \quad \text{Ecuación No.3 = \% inhibición DPPH}$$

El valor para el porcentaje de inhibición se interpola en la curva de calibración para el radical DPPH (Anexo A), generando valores de equivalentes en milimoles de Trolox por cada miligramo de extracto libre de disolvente (Eq mmol Trolox / mg_{extracto}). La ecuación 2 es acorde con reportes de literatura [11] [20] [51] [53]. En el blanco se reemplazó la muestra por etanol. Los resultados se interpretan sabiendo que un buen antioxidante decolora fuertemente la solución.

3.2.3.2.2 Decoloración del β-caroteno

Para la cuantificación de la calidad, con base en el método del blanqueamiento del β-caroteno, se realizó acorde a la literatura [39]. Este método consistió en tomar 500 μL de β-caroteno a una concentración de 1,2 mg/mL en acetona, evaporar la acetona y posteriormente adicionar 20 μL de ácido linoleico, para que este último actúe como centro de oxidación. Luego se suministraron 200 μL Tween 40, para que sirva de surfactante entre la fase oleosa y fase acuosa. A la anterior mezcla se adicionaron 200 μL extracto y 50 mL H₂O (Saturada con oxígeno por burbujeo durante 12h), se agitó fuerte y se llevó a ultrasonido (36 kHz por 10min), luego se incubó a 50 °C con sonificado cada 2 min. hasta las 2 h. La lectura de absorbancia se hace a 470 nm cada 10 min por 2 h. Se compara contra el patrón de β-caroteno. En el patrón se usaron 200 μL de metanol a cambio de la muestra.

$$A.A. = \frac{(A_{Patrón} - A_{muestra})}{A_{Patrón}} \times 100 \text{ Ecuación No.4} = A.A. \text{ blanqueamiento } \beta\text{-caroteno}$$

Para la prueba de decoloración de β-caroteno se determinó el porcentaje de inhibición de la decoloración con base en un patrón de trabajo, que permitió evaluar el efecto del extracto con respecto a la libre de-coloración del β-caroteno (sin aditivos). Como se muestra en la ecuación 3, que corresponde con la literatura [49] [51]. Un buen antioxidante evita la decoloración de la solución.

3.2.3.2.3 Análisis por CG-EM de los extractos obtenidos de mandarina

La evaluación de la calidad en los extractos de epicarpio de mandarina (EM), obtenidos mediante la técnica de EFSFC-EtOH en el equipo fabricado, se realizó con base en el contenido de limoneno, componente mayoritario reportado en literatura. El porcentaje de limoneno en el aceite esencial del epicarpio de mandarina oscila entre 57,4% [47] hasta 79,5% [54]. El estudio se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Las condiciones en la que se realizaron los análisis por GC-MS para los extractos de epicarpio de mandarina (*Citrus reticulata*), variedad *clementina* fueron: (i) columna HP-5MS, (ii) temperatura inicial 40 °C por 5 min, aumento hasta 160 °C a 4°C/min, de 160 a 220 °C a 2,5 °C/min, de 220 a 280 °C a 8 °C/min, finalmente 4 min a 280 °C, (iii) divisor de flujo con relación 1:10, (iv) flujo en columna 1,20 mL/min, (v) temperatura del inyector 250 °C, (vi) volumen de inyección 1 μL, (vii) rango de detector de masas 40-705 m/z, (viii) temperatura de la interfase gases masas 275 °C.

3.2.3.3 Análisis estadístico de los datos

Los datos reportados para el rendimiento y calidad son el promedio de los valores obtenidos por triplicado. La comparación entre grupos de datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). Adicionalmente dichos resultados fueron contrastados con los obtenidos por otros autores.

En los casos en los que solo se tiene un dato reportado, éste se evalúa según pertenezca o no al rango del promedio más o menos una vez la desviación estándar.

En los extractos del epicarpio de mandarina-EM (*Citrus reticulata*) los índices de Kovats (IK) se promedian para compararlos contra los valores reportados en literatura.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La primera etapa del trabajo permitió construir el aparato para EFS. Posteriormente, se obtuvieron extractos a partir de hojas de orégano-HO (*Lippia origanoides*), semillas de guayaba-SG (*Psidium guajava*), semillas de papaya-SP (*Carica papaya*), y epicarpio de mandarina-EM (*Citrus reticulata*), en cada caso se determinó el rendimiento de la extracción. Para finalizar, se midió la actividad antioxidante de los extractos de HO, SG y SP, mediante los métodos DPPH y decoloración del β -caroteno. Por otra parte los extractos obtenidos de dos variedades de mandarina (*común* y *clementina*) se compararon en cuanto a rendimiento en las técnicas de arrastre con vapor (AV) y Soxhlet (SH) con mezcla de hexanos. La comparación del rendimiento favoreció a la *mandarina clementina* por lo cual está variedad para ser sometida a la técnica de extracción con fluidos supercríticos en flujo constante con etanol como modificador (EFSFC-EtOH).

Los resultados propios fueron comparados contra los obtenidos en equipos similares sobre las correspondientes matrices.

4.1 Diseño y construcción del equipo para EFS

El equipo diseñado y construido permitió realizar de forma rápida las operaciones de carga y descarga de la muestra a extraer, gracias al sistema de cierre y apertura.

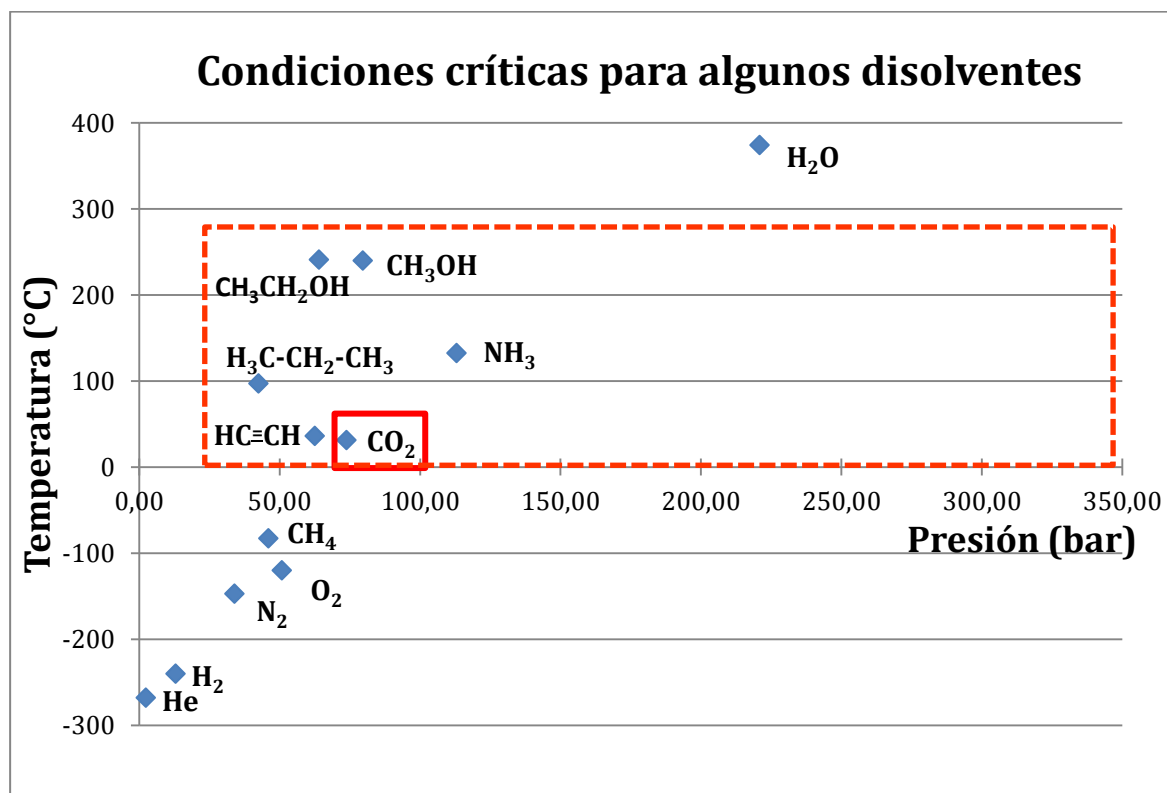
Se verificó la ausencia de fugas, primero en condiciones de baja presión con temperatura ambiente y posteriormente a condiciones de trabajo, comenzando con un líquido (EtOH) y luego con un gas (CO_2). La búsqueda de fugas se realizó primero con etanol, ya que en caso de ruptura o pérdida de sujeción de una pieza sometida a presión en el sistema, ésta no es expulsada a alta velocidad, debido al bajo factor de compresión para los líquidos. Distinto a lo que ocurre al emplear un gas, ya que existirá el riesgo de expulsión de piezas o ruptura.

El sistema de calefacción se basa en resistencias de cantal, recubiertas con fundas siliconadas, que se conectaron en serie y/o paralelo, para disipar la cantidad de calor requerida en cada parte. El sistema de calentamiento se configuró para aumentar la temperatura hasta un valor máximo esperado de 180°C , teniendo control de $\pm 1^\circ\text{C}$.

La válvula de regulación de presión anterior (BPR) permitió el control en las condiciones de trabajo. Para la prueba de funcionamiento de la BPR se inició desde la apertura total hasta el cierre completo. Realizar la prueba de la BPR invirtiendo los pasos genera sobrepresiones que la dañan, más aun cuando la bomba utilizada se sobredimensionó.

En la Figura No.41 se relacionan distintos fluidos con sus respectivas condiciones críticas (P_c , T_c). Se resalta en un recuadro punteado los límites de presión y de temperatura dentro de los cuales el aparato diseñado puede ser operado en forma segura. Dentro de

los posibles disolventes a emplear se descartan los que están fuera de la zona de trabajo y los que son tóxicos, inflamables o combustibles. Lo anterior, junto con las condiciones usadas por otros autores, orientó a usar como disolvente el dióxido de carbono (CO_2), enmarcado en línea continua.



--- Área de trabajo para el equipo diseñado. — disolvente elegido (CO_2).

Figura No.41. Zona de trabajo (Presión y Temperatura), para el aparato construido.

El extractor construido permite emplear como disolvente CO_2 puro, CO_2 con modificador de polaridad o líquidos presurizados; dicho extractor puede ser operado en forma discontinua o continua. Cabe mencionar que las líneas de alimentación y de salida de la cámara de extracción pueden ser intercambiadas. El sistema de by-pass incorporado al aparato posibilita la calibración de flujos, sin pasar por la cámara de extracción.

4.2 Rendimiento y calidad de los extractos obtenidos.

El sistema para extracción construido permitió obtener extractos a partir de las biomásas propuestas (HO, SG, SP y EM), bajo diferentes condiciones (CO_2 o CO_2 -EtOH, en flujo discontinuo o continuo-FC).

4.2.1 Rendimiento de los extractos obtenidos.

Respecto a los rendimientos obtenidos, los resultados se agrupan de acuerdo a la biomasa tratada, ver Figura No.42. Los datos son el promedio de tres replicas para cada caso, con su respectiva desviación estándar.

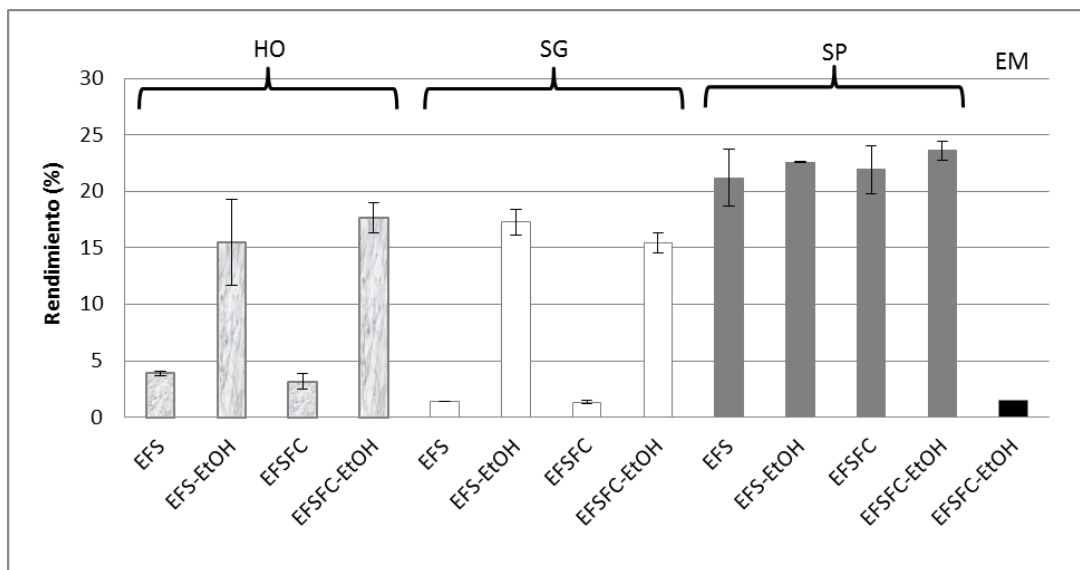


Figura No.42 Rendimiento en extracto a partir de las biomásas tratadas.

Respecto a HO y SG el rendimiento del extracto obtenido empleando $\text{CO}_2\text{-EtOH}$ es muy superior al obtenido con CO_2 puro, tanto en modo discontinuo como en modo continuo (entre 15 y 20%). Para SP el rendimiento del extracto empleando $\text{CO}_2\text{-EtOH}$ es ligeramente superior al obtenido con CO_2 puro, tanto en modo discontinuo como en modo continuo, dicha biomasa presentó el mayor rendimiento (entre 20 y 25 %). Para el epicarpio de mandarina (EM) variedad *clementina* sometido a EFSFC-EtOH se obtuvo un rendimiento de 1,91 %. Para esta última biomasa vale la pena aclarar que el EM *var.clementina* (epicarpio grueso y rugoso) presentó un rendimiento de 6,99 % por Soxhlet y 0,19 % por arrastre con vapor, mientras que para el EM variedad *común* (epicarpio delgado y liso) los rendimientos por Soxhlet (3,95 %) y por arrastre con vapor (0,15%) fueron menores. Por tanto la variedad *clementina* fue la que se sometió a EFSFC-EtOH. En la Tabla No.8 se contrastan los resultados del presente trabajo contra los obtenidos por otros autores. El rendimiento en extracto para HO no presentó diferencias significativas con el obtenido por Vasquez [39] y Cavero [49], tanto sin modificador como usando éste. Respecto a los extractos obtenidos para SG y SP, dichos valores son similares a los reportados por Castro [2], [50]. Con relación a EM, en *Citrus reticulata* blanco usando EFS (CO_2 a 50 °C, 100 bar y 350 min.) se obtuvo un rendimiento del 2,26 % [52], valor superior al obtenido en este trabajo (1,91%) mediante EFSFC-EtOH (50 °C, 100 bar, 20 min., 10 % EtOH).

Tabla No.8 Comparación de rendimientos.

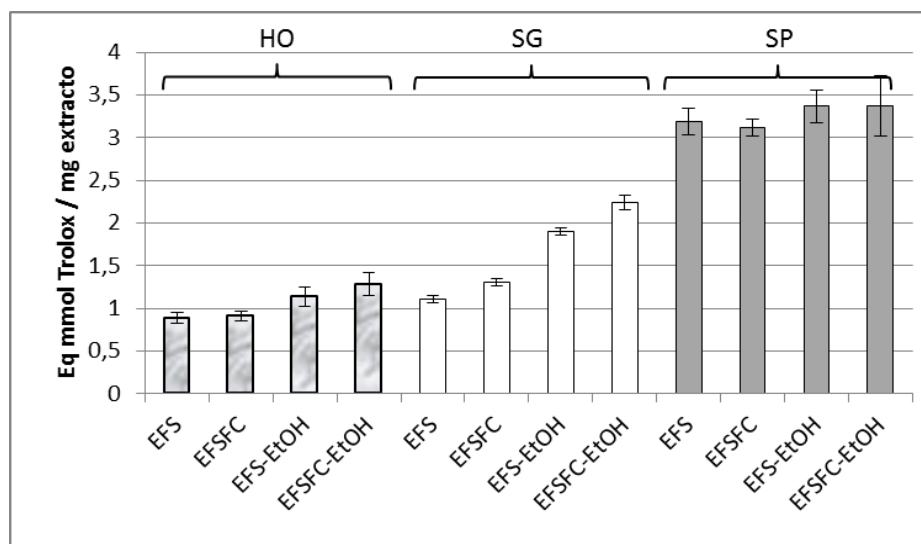
PORCENTAJE DE RENDIMIENTO EN BASE SECA										
HO			SG			SP			EM (var.clementina)	
Método de extracción	Prom.	Desv. Est.	Método de extracción	Prom.	Desv. Est.	Método de extracción	Prom.	Desv. Est.	Método de extracción	Prom.
EFS	3,91	0,21	EFS	1,42	0,04	EFS	21,18	2,53	EFS	-
EFS-EtOH	15,5	3,82	EFS-EtOH	17,28	1,15	EFS-EtOH	22,58	0,04	EFS-EtOH	-
EFSFC	3,16	0,69	EFSFC	1,36	0,11	EFSFC	21,92	2,11	EFSFC	-
EFSFC-EtOH	17,6	1,33	EFSFC-EtOH	15,43	0,91	EFSFC-EtOH	23,59	0,8	EFSFC-EtOH	1,91
EFS [39]	3,84	0,21	EFS [2]	1,39	0,02	EFS [50]	20,42	0,62	EFS [52]	2,26
EFS-EtOH[49]	15,61	*	EFS-EtOH [19]	16,37	0,2	EFS-EtOH [50]	22,52	0,06		
						EFSFC [2]	22,09			

* Datos únicos, sin desviación estándar.

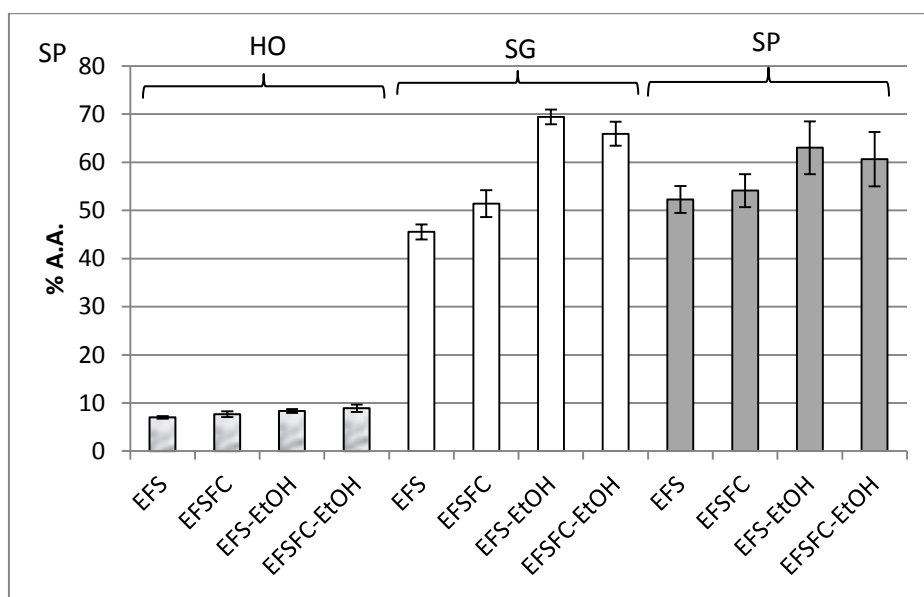
4.2.2 Calidad de los extractos obtenidos

En las biomásas HO, SG y SP la A.A. sirvió para determinar la calidad de los extractos obtenidos, por su parte para EM la calidad se determinó por el contenido de componentes volátiles analizados por CG-EM. Respecto a la A.A. en el caso del radical DPPH (color púrpura), que actúa como agente oxidante la coloración es inversamente proporcional al poder reductor del extracto, luego el porcentaje de decoloración se comparó mediante la curva de calibración del patrón Trolox (anexo C), reportando los resultados con base en sus equivalentes Trolox (ET); para el método de la decoloración del β -caroteno (color amarillo), la efectividad del extracto se ve reflejada en la protección que ofrece contra la decoloración de β -caroteno, en presencia de oxígeno y ácido linoleico, consecuentemente la protección es directamente proporcional a la coloración que persiste, haciendo la curva de calibración con α -tocoferol como patrón (anexo D).

Mediante los dos métodos empleados para determinar la A.A., en los extractos obtenidos por EFS, se observó que el empleo de modificador de polaridad (EtOH) favorece la actividad antioxidante, ver Figura No.43. Lo anterior, posiblemente por la estructura fenólica (hidrofílica) que presentan gran parte de los compuestos con actividad antioxidante (los cuales se relacionaron en la tabla No.4). Los extractos obtenidos a partir de HO presentaron el menor valor por ambos métodos de medición de la A.A. Los extractos de SP son más activos ante la actividad antioxidante evaluada por el método del radical DPPH, mientras que los extractos de SG presentaron la mayor actividad mediante el ensayo por decoloración de β -caroteno.



(a)



(b)

Figura No.43 Actividad antioxidante (A.A.) de los extractos de HO, SG y SP.

Al observar un aumento marcado de la actividad antioxidante en las SG por adición de modificador, se infiere que gran parte de las sustancias con dicha actividad pueden ser de carácter hidrofílico, caso contrario ocurre con las SP.

También de la Figura No.43 se puede inferir que los dos métodos no son equivalentes y que el método del DPPH favorece la determinación de extractos hidrofílicos, contrario al blanqueamiento de β -caroteno que mejora determinaciones en extractos lipofílicos.

Tabla No.9. Resultados de actividad antioxidante (A.A.) para extractos de HO, SG y SP.

(a)

MÉTODO DEL RADICAL DPPH								
HO			SG			SP		
Método de extracción	Prom.	Unidad	Método de extracción	Prom.	Unidad	Método de extracción	Prom.	Unidad
EFS	0,89	Eq	EFS	1,11	Eq	EFS	3,19	Eq
EFSFC	0,91	Eq	EFSFC	1,31	Eq	EFSFC	3,12	Eq
EFS-EtOH	1,14	Eq	EFS-EtOH	1,90	Eq	EFS-EtOH	3,37	Eq
EFSFC-EtOH	1,28	Eq	EFSFC-EtOH	2,24	Eq	EFSFC-EtOH	3,38	Eq
EFS [39]	0,87	Eq	EFS [19]	1,0	Eq	S-L [53]	35,9	A.A.
AV [39]	0,77	Eq	EFS-EtOH [19]	1,3	Eq	S-L [55]	64,61	EC ₅₀
HD [39]	0,74	Eq	SH, EtOH 70% [22]	93,59	A.A.	S-L [48]	14,19	IC ₅₀
EFS-EtOH [49]	69,1	EC ₅₀	SH, EtOH 70% [22]	0,26	IC ₅₀	S-L [51]	4,09	mg Vit

Eq = Equivalentes en milimoles de Trolox por cada miligramo de extracto (eq mmol Trolox/mg extracto).

EC₅₀ = Concentración a la cual se presenta el 50% de extinción de una especie (EC₅₀ (mg/mL).

IC₅₀ = Concentración a la cual se presenta el 50% de inhibición de un efecto (IC₅₀ (mg/mL).

A.A. = Porcentaje de A.A. respecto a un patron a una concentración de 1 miligramo por cada mililitro (% A.A. a 1mg/mL).

mg vit = Comparación del extracto con respecto al efecto producido por la vitamina E (mg vitamina E/100 mg extracto).

(b)

MÉTODO DE BLANQUEAMIENTO DE β-CAROTENO								
HO			SG			SP		
Método de extracción	Prom.	Unidad	Método de extracción	Prom.	Unidad	Método de extracción	Prom.	Unidad
EFS	20,96	% Inhib.	EFS	45,53	% Inhib.	EFS	52,27	% Inhib.
EFSFC	22,09	% Inhib.	EFSFC	51,40	% Inhib.	EFSFC	54,13	% Inhib.
EFS-EtOH	23,26	% Inhib.	EFS-EtOH	69,43	% Inhib.	EFS-EtOH	63,03	% Inhib.
EFSFC-EtOH	24,27	% Inhib.	EFSFC-EtOH	65,93	% Inhib.	EFSFC-EtOH	60,67	% Inhib.
EFS [39]	20,30	% Inhib.	EFS [21]	41	% Inhib.	S-L [51]	59	% Inhib.
EFS-EtOH [49]	56	% In.40	EFS-EtOH [21]	63	% Inhib.	S-L [51]	120	μg β

% Inhib. = porcentaje de inhibición de la decoloración del β-caroteno respecto al α-tocoferol.

% In.40 = porcentaje de inhibición de la decoloración del β-caroteno a concentración de 40 mg extracto/mL.

μg β = Equivalencia en microgramos de β-caroteno por cada 100 g de muestra.

En la Tabla No.9 se presentan los datos para HO, SG y SP obtenidos en el presente trabajo y por otros autores, dando el método de extracción y la referencia del autor (los datos superiores de cada tabla corresponden a los obtenidos en el presente trabajo). Adicionalmente se relacionan datos obtenidos por otras técnicas de extracción (extracción sólido-líquido, S-L; Soxhlet, SH; hidrodestilación, HD, arrastre con vapor, AV).

Ya que se usaron condiciones de extracción semejantes a las reportadas en literatura (fase extractante, presión, temperatura y flujo de extracción, continuo o discontinuo), es posible contrastar contra los resultados de otros autores, al expresar la A.A. en unidades similares o idénticas. Por otra parte, al contrastar los datos experimentales para los extractos obtenidos contra el valor de A.A. encontrado por DPPH para el antioxidante comercial BHT (2,67 Eq mmol Trolox / mg BHT), todos los extractos obtenidos de SP superaron en A.A. a dicho antioxidante comercial, y el extracto de SG obtenido por EFSFC-EtOH es ligeramente inferior en A.A.

De manera general es posible afirmar que los extractos de HO obtenidos en el presente trabajo presentaron una A.A. ligeramente superior a la reportada por otros autores, mediante radical DPPH, y un valor intermedio respecto a valores reportados por decoloración de β -caroteno. Los extractos obtenidos de SG presentaron una mayor A.A., tanto por radical DPPH como por decoloración de β -caroteno, respecto a lo reportado por otros autores. Los extractos obtenidos de SP presentaron una A.A. (por decoloración de β -caroteno) similar a la determinada por Maisarah y col. [51].

Respecto al epicarpio de mandarina-EM, es preciso recordar que los valores de rendimiento para arrastre con vapor (AV) y Soxhlet (SH) para var. *común* (cascara delgada y lisa) fueron 0,15 y 3,95%, respectivamente, mientras que para var. *clementina* (cascara gruesa y rugosa) los resultados en el mismo orden fueron de 0,19 y 6,99%. Por ende se escogió la var. *clementina* para someterla a EFSFC-EtOH. Los tres extractos de EM variedad *clementina* ((i) AV, (ii) SH, y (iii) EFSFC-EtOH) fueron sometidos a análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La identificación del pico correspondiente al limoneno se realizó mediante la determinación del índice de Kovats (Tabla No.10) y el patrón de fragmentación en espectrometría de masas (Figura No.44).

Tabla No.10. Índices de Kovats (IK) experimentales para el pico de limoneno.

Matriz / método	t_r limoneno	IK
Epicarpio de <i>mandarina var. clementina</i> , Arrastre con vapor	18,506	1031,9
Epicarpio de <i>mandarina var. clementina</i> , Soxhlet	18,519	1032,2
Epicarpio de <i>mandarina var. clementina</i> , EFSFC-EtOH	18,513	1032,1
	Promedio	1032,2

Los resultados se analizaron con base en las recomendaciones dadas por Stachenko, 2010 [56]. Los índices de Kovats (IK) de la tabla Tabla No.10, se determinaron con base

en la ecuación No.5. El promedio del IK en el presente trabajo, para limoneno está dentro de los valores reportados por otros autores: 1030 [57], 1035 [58], 1038 [59] y 1044 [60] usando columnas capilares HP-5MS.

$$IK = 100n + 100 * \left(\frac{\log t_{rx} - \log t_{rn}}{\log t_{rN} - \log t_{rn}} \right) \quad \text{Ecuación No.5. = Índice de Kovats}$$

Donde:

IK = índice de Kovats

n = número de carbonos de la parafina que eluye inmediatamente antes del pico de interés.

t_{rx} = tiempo medio de retención para el pico de interés que desea ser identificado en el cromatograma de gases bajo iguales condiciones cromatograficas que un conjunto de parafinas.

t_m = tiempo de retención de la parafina que eluye inmediatamente antes del pico de interés.

t_{rN} = tiempo de retención de la parafina que eluye inmediatamente después del pico de interés.

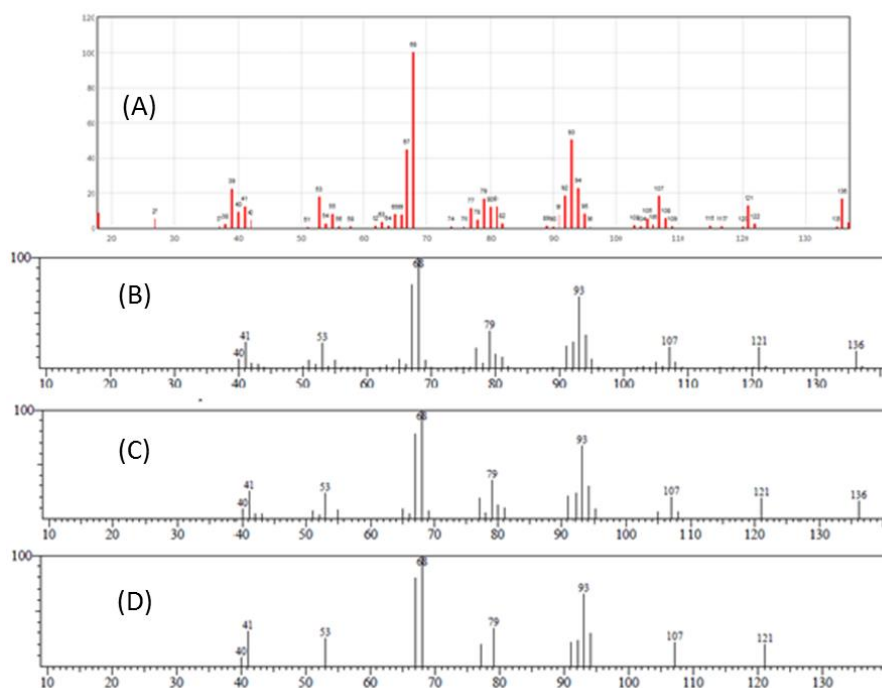


Figura No.44. Patrones de rompimiento para espectrometría de masas de los picos asignados al limoneno.

Los espectros de masas del limoneno se muestran en la figura No.44, de acuerdo al siguiente orden: (A) el reportado en la base de datos de la NIST, (B) el correspondiente al extracto obtenido por arrastre con vapor, (C) el obtenido por extracción Soxhlet y (D) el obtenido por EFSFC-EtOH.

Los patrones de rompimiento junto con los IK permitieron identificar el limoneno en los extractos obtenidos desde el epicarpio de mandarina-EM (*C. reticulata*) var. *clementina*.

Tabla No.11. Área para los picos de limoneno en extractos epicarpio *var. clementina*.

Técnica y matriz	t_{ret} (min)	Área	Área / Masa extracto	Área / Masa matriz
Arrastre con vapor, epicarpio de <i>mandarina var. clementina</i>	18,506	21282261	127286250	118235
Soxhlet, epicarpio de <i>mandarina var. clementina</i>	18,519	1312810	8900407	37509
EFSFC-EtOH, epicarpio de <i>mandarina var. clementina</i>	18,513	141748	2154225	44296

En la tabla No.11 se muestra la información de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), relacionada con el analito de interés (limoneno), para los extractos obtenidos a partir de *var. clementina*. Se observan los resultados de área del analito respecto a la masa de extracto y de área del analito respecto a la masa de material vegetal de la cual procede el respectivo extracto. Por otra parte, la EFSFC-EtOH resulta más adecuada debido al tiempo de extracción (AV 150 min, Soxhlet 90 min y EFSFC-EtOH 20 min.), La potencia disipada para calentamiento exige menos los controladores usados en EFSFC-EtOH (AV 650 W, Soxhlet 430 W y EFSFC-EtOH 240 W). La cantidad de energía requerida para calentamiento es menor para EFSFC-EtOH (AV 5850000 J, Soxhlet 2322000 J y EFSFC-EtOH 288000 J). En el caso de la EFSFC-EtOH se requiere energía para aumentar la presión teniendo un promedio de potencia de 200 W en el compresor de aire, con lo que en cada extracción se consumen 240000 J, para la presurización. Considerando la cantidad de extracto obtenido por cada metodología (AV 0,1672 g, SH 0,1475 g y EFSFC-EtOH 0,0658 g), el costo energético para obtener un gramo de extracto (AV 34988038 J, SH 15742373 J y EFSFC-EtOH 8024316 J) favorece la EFSFC-EtOH.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El aparato fabricado puede ser aplicado para obtener extractos en flujo continuo, discontinuo o la combinación de estos. Con este aparato se obtuvieron extractos a partir de HO, SG y SP con rendimiento semejante a los reportados por otros autores.

El equipo de extracción con fluidos supercríticos-EFS diseñado y construido puede emplear CO₂ puro o con modificador, y permite obtener extractos con A.A. similar a la reportada por otros autores en sus equipos, trabajando sobre las matrices HO, SG y SP.

La versatilidad que se esperaba fue lograda con el equipo diseñado y construido, ya que se puede trabajar en condiciones de flujo discontinuo o continuo con un mismo equipo, permitiendo modificar las condiciones de temperatura, presión, flujo, tiempo y polaridad de la fase extractante durante el proceso de extracción. Incluso es posible extraer en flujo discontinuo (bach) y luego pasar a flujo continuo para una misma muestra dentro del mismo equipo, como se puede inferir de las curvas de extracción dadas por Castro [50]. Lo anterior debido a que al inicio de la extracción son determinantes los procesos difusivos, y se reduce la cantidad de fase extractante utilizada al trabajar en bach. La combinación (estático-dinámico) descrita ya fue reportada en literatura [15] [23] [32].

El extracto obtenido de EM por EFSFC-EtOH presentó como componente mayoritario al limoneno, lo cual hace posible que dicha técnica pueda ser aplicada a residuos de epicarpio de mandarina.

Los resultados dan una satisfactoria prueba de la equivalencia en cuanto a los parámetros de rendimiento y calidad, en los extractos obtenidos para las matrices trabajadas (HO, SG, SP y EM).

Aunque en la tabla No.7 se muestra un mayor porcentaje de rendimiento para la técnica de extracción Soxhlet, aplicada a epicarpio de mandarina (*var.común* y *var.clementina*). Se concluye que el extracto obtenido por Soxhlet contiene baja cantidad de limoneno (tabla No.11), evidencia del daño al limoneno por calentamiento durante la extracción.

Energeticamente es favorable la EFSFC-EtOH con respecto a las técnicas AV y SH al trabajar sobre EM-*var. clementina*.

5.2 Recomendaciones

Una considerable parte de los costos transferidos al valor final del extracto se encuentran determinados por el dióxido de carbón (CO₂), por lo cual es recomendable recircular el CO₂ [15] [17] [18]. Al reducirse el valor por gramo de extracto se hacen viables procesos que no lo son actualmente.

Una trampa criogénica al final de la zona de alta presión permite condensar los volátiles de los extractos, esto es determinante sobre todo en epicarpio de mandarina-EM (*Citrus reticulata*), dado que esto puede incrementar el rendimiento. La trampa criogénica es indispensable en el caso de considerar la sugerencia dada en el párrafo anterior para el cierre del sistema y la recirculación del dióxido de carbono.

La conservación de la presión en el sistema se lleva a cabo por medio de la válvula reguladora de presión anterior (BPR), pero se presentan fluctuaciones en la presión, que obligan a la permanente manipulación de la misma. Por lo anterior se sugiere el uso de un capilar como restrictor a la salida de la válvula BPR, con el fin de aliviar la diferencia de presión a la que se ve sometida.

Una precaución a largo plazo es el uso de un electrodo de sacrificio que concentre en él la oxidación. El potencial de reducción de todas las piezas no es el mismo ya que al existir por lo menos dos metales o aleaciones distintas, existe un par galvánico, lo cual puede ocasionar corrosión puntual.

Realizar ensayos con una primera etapa de extracción en forma estática, que permita superar la etapa difusiva y después realizar una etapa dinámica como se recomienda en la literatura [15] [23] [32].

Anexo A: ANOVA, para análisis de datos de rendimiento HO, SG y SP

Comparaciones experimentales de rendimiento HOJAS DE OREGANO							Tabla : F _{tabulada} (5%) = 3,35
Método de extracción	Prom.	Desv. Est.		Método de extracción	Prom.	Desv. Est.	
EFS	3,91	0,21	vs	EFS [39]	3,84	0,21	0,21
EFS-EtOH	15,48	3,82	vs	EFS-EtOH [49]	15,61	*	Entre Prom ± 1*Desv.Est
EFSFC	3,16	0,69	vs	EFS	3,91	0,21	3,24
EFSFC-EtOH	17,62	1,33	vs	EFS-EtOH	15,48	3,82	2,05

Comparaciones experimentales de rendimiento SEMILLAS DE GUAYABA							Tabla : F _{tabulada} (5%) = 3,35
Método de extracción	Prom.	Desv. Est.		Método de extracción	Prom.	Desv. Est.	
EFS	1,42	0,04	vs	EFS [61]	1,39	0,02	1,55
EFS-EtOH	17,28	1,15	vs	EFS-EtOH [61]	16,37	0,2	1,87
EFSFC	1,36	0,11	vs	EFS	1,42	0,04	0,84
EFSFC-EtOH	15,43	0,91	vs	EFS-EtOH	17,28	1,15	7,68

Comparaciones experimentales de rendimiento SEMILLAS DE PAPAYA							Tabla : F _{tabulada} (5%) = 3,35
Método de extracción	Prom.	Desv. Est.		Método de extracción	Prom.	Desv. Est.	
EFS	21,18	2,53	vs	EFS [50]	20,42	0,62	0,26
EFS-EtOH	22,58	0,04	vs	EFS-EtOH [50]	22,52	0,06	2,6
EFSFC	21,92	2,11	vs	EFSFC [16]	22,09	*	Entre Prom + 1*Desv.Est
EFSFC-EtOH	23,59	0,8	vs	EFS-EtOH	22,58	0,04	4,76

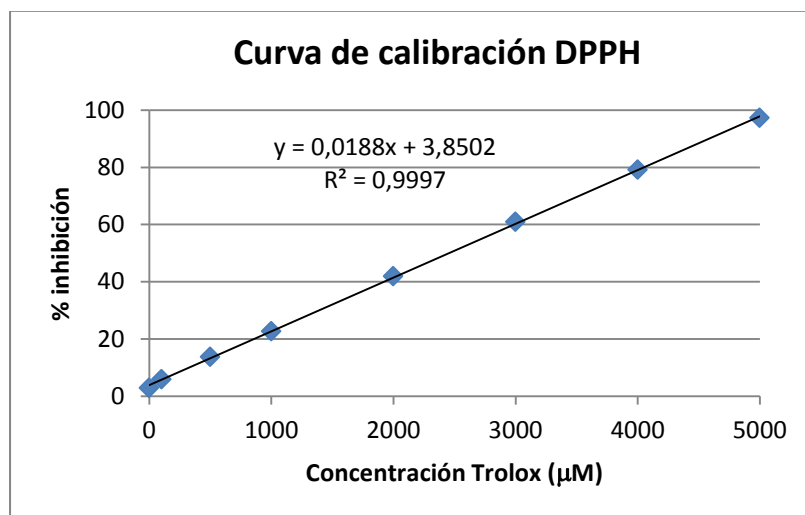
Anexo B: ANOVA, para análisis de datos de calidad HO, SG y SP

Comparación resultados de calidad Hoja de Oregano-HO (<i>Lippia origanoide</i>)													Tabla : F _{tabulada} (5%) = 3,35
	R1	R2	R3	Prom.	Desv.Est.			R1	R2	R3	Prom.	Desv.Est.	
EFS DPPH	1,0	0,8	0,9	0,89	0,06	vs	EFS [39]	1,0	0,8	0,8	0,87	0,1	0,25
EFS β -caroteno	7,0	6,8	7,3	7,02	0,25	vs	EFS [39]	6,3	7,1	6,5	6,64	0,39	2,76

Comparación resultados de calidad Semillas de Guayaba-SG (<i>guajava</i>)													Tabla : F _{tabulada} (5%) = 3,35
	R1	R2	R3	Prom.	Desv.Est.			R1	R2	R3	Prom.	Desv.Est.	
EFS DPPH	24,3	17,0	17	19,4	4,24	vs	EFS [2]	19,1	20,5	18,4	19,35	1,06	0,00039
EFS β -caroteno	52,2	37,6	48	45,9	7,5	vs	EFS [2]	43,7	39,9	39,0	40,86	2,5	1,305

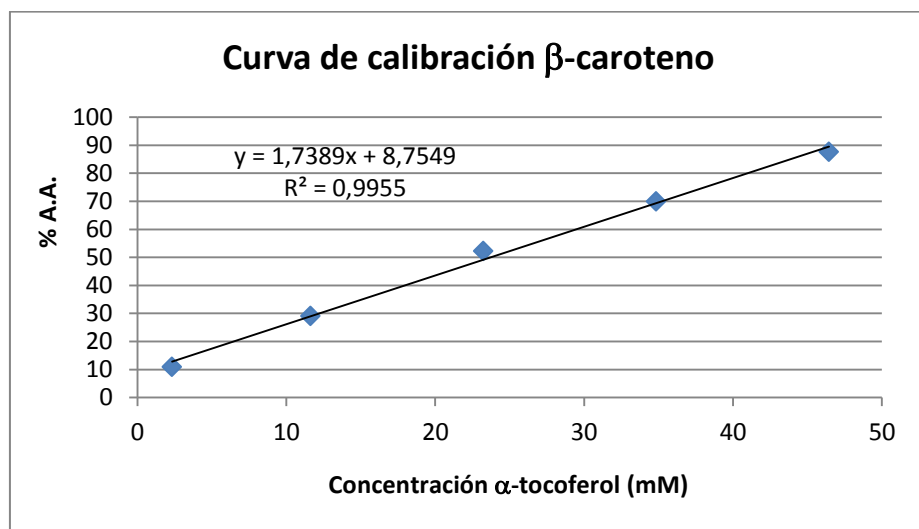
Comparación resultados de calidad Semillas de Papaya-SP (<i>Carica papaya</i>)													Tabla : F _{tabulada} (5%) = 3,35
	R1	R2	R3	Prom.	Desv.Est.			R1	R2	R3	Prom.	Desv.Est.	
EFS DPPH	107,0	120,0	129	118,7	11,06	vs	EFS-EtOH [19]	127,0	132,0	133,0	130,7	3,21	3,43
EFS β -caroteno	68,1	71,6	68	69,2	2,08	vs	EFS-EtOH [19]	64,9	57,2	67,3	63,13	5,28	3,607

Anexo C: Curva de calibración para la A.A. por radical DPPH



Datos para la curva de calibración en % A.A. para β-caroteno	
Concentración α-tocoferol (mM)	% A.A. 470 nm
2,32	10,9
11,61	29,1
23,22	52,2
34,83	69,9
46,44	87,6

Anexo D: Curva de calibración para el blanqueamiento del β -caroteno



Datos para la curva de calibración en % A.A. para β -caroteno	
Concentración α -tocoferol (mM)	% A.A. 470 nm
2,32	10,9
11,61	29,1
23,22	52,2
34,83	69,9
46,44	87,6

Bibliografía

- [1] S. Panitchpakdi, "Informe sobre el comercio y el desarrollo," in *Conferencia de las Naciones Unidas sobre comercio y desarrollo, Ginebra*, 2011, pp. 1–18.
- [2] H. I. Castro-Vargas, L. I. Rodríguez-Varela, and F. Parada-Alfonso, "Guava (*Psidium guajava* L.) seed oil obtained with a homemade supercritical fluid extraction system using supercritical CO₂ and co-solvent," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 56, no. 3, pp. 238–242, 2011.
- [3] J. Cezar, F. Johner, M. Angela, and D. A. Meireles, "Construction of a supercritical fluid extraction (SFE) equipment: validation using annatto and fennel and extract analysis by thin layer chromatography coupled to image," *Food Sci. Technol.*, vol. 36, no. 2, pp. 210–247, 2016.
- [4] S. Race, "The truth about BHA, BHT, TBHQ and other antioxidants used as food additives," in *Antioxidants used as food additives*, UK: Tigmor Books, 2009, p. 20.
- [5] T. Umemura *et al.*, "Nine-week detection of six genotoxic lung carcinogens using the rasH2/BHT mouse model," *Cancer Lett.*, vol. 231, no. 2, pp. 314–318, 2006.
- [6] M. Eskandani, H. Hamishehkar, and J. Ezzati Nazhad Dolatabadi, "Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive," *Food Chem.*, vol. 153, pp. 315–320, 2014.
- [7] J. Azmir *et al.*, "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review," *J. Food Eng.*, vol. 117, no. 4, pp. 426–436, 2013.
- [8] A. Mustafa and C. Turner, "Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 703, no. 1, pp. 8–18, 2011.
- [9] A. Nisha, K. Udaya Sankar, and G. Venkateswaran, "Supercritical CO₂ extraction of *Mortierella alpina* single cell oil: Comparison with organic solvent extraction," *Food Chem.*, vol. 133, no. 1, pp. 220–226, 2012.
- [10] V. F. Péres *et al.*, "Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth," *J. Chromatogr. A*, vol. 1105, no. 1–2 SPEC. ISS., pp. 115–118, 2006.
- [11] Z. Zeković, A. Bušić, D. Komes, J. Vladić, D. Adamović, and B. Pavlić, "Coriander seeds processing: Sequential extraction of non-polar and polar fractions using supercritical carbon dioxide extraction and ultrasound-assisted extraction," *Food*

- Bioprod. Process.*, vol. 95, pp. 218–227, 2015.
- [12] E. Reverchon, “Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 10, no. 1, pp. 1–37, 1997.
- [13] P. T. V Rosa and M. A. A. Meireles, “Supercritical technology in Brazil: System investigated (1994-2003),” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 34, no. 2 SPEC. ISS., pp. 109–117, 2005.
- [14] M. D. a Saldaña, R. S. Mohamed, and P. Mazzafera, “Extraction of cocoa butter from Brazilian cocoa beans using supercritical CO₂ and ethane,” *Fluid Phase Equilib.*, vol. 197, pp. 885–894, 2002.
- [15] C. L. C. Albuquerque and M. A. A. Meireles, “Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 66, pp. 86–94, 2012.
- [16] H. I. Castro-Vargas, P. Benelli, S. R. S. Ferreira, and F. Parada-Alfonso, “Supercritical fluid extracts from tamarillo (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp and its application as protectors against lipid oxidation of cooked beef meat,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 76, pp. 17–23, 2013.
- [17] M. D. . V. M. . T. M. T. Luque de Castro, *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*. Barcelona, España: Editorial Reverte, 1993.
- [18] A. . V. G. Bertucco, *High Pressure Process Technology: Fundamentals and Applications*. Padova, Italia: Industria Chemistry Library, 2001.
- [19] H. Castro, L. P. Restrepo, and F. Parada, “Semillas de Guayaba: ¿Residuo o subproducto?,” *INIA Divulg.*, vol. Capitulo 8, no. Parte 3, pp. 189–198, 2010.
- [20] M. A. Hernández-acosta, H. I. Castro-vargas, and F. Parada-alfonso, “Integrated Utilization of Guava (,” vol. 22, no. 12, pp. 2383–2390, 2011.
- [21] J. Moon and T. Shibamoto, “Antioxidant Assays for Plant and Food Components Antioxidant Assays for Plant and Food Components,” vol. 57, no. January, pp. 1655–1666, 2009.
- [22] S. Norshazila, S. Z. I, M. S. K, K. R. K, and A. MR, “Antioxidant Levels and Activities of Selected Seeds of Malaysian Tropical Fruits,” vol. 16, no. 1, pp. 149–159, 2010.
- [23] A. Özcan and A. S. Özcan, “Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the quantification of hydrocarbons from *Euphorbia macroclada*,”

- Talanta*, vol. 64, no. 2, pp. 491–495, 2004.
- [24] D. Biscaia and S. R. S. Ferreira, "Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 51, no. 1, pp. 17–23, 2009.
- [25] M. Herrero, A. Cifuentes, and E. Ibañez, "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review," *Food Chem.*, vol. 98, no. 1, pp. 136–148, 2006.
- [26] R. Chen, F. Meng, S. Zhang, and Z. Liu, "Effects of ultrahigh pressure extraction conditions on yields and antioxidant activity of ginsenoside from ginseng," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 66, no. 2, pp. 340–346, 2009.
- [27] E. M. Z. Michielin, L. P. De Lemos Wiese, E. A. Ferreira, R. C. Pedrosa, and S. R. S. Ferreira, "Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 56, no. 1, pp. 89–96, 2011.
- [28] Q. Lang and C. M. Wai, "Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - A practical review," *Talanta*, vol. 53, no. 4, pp. 771–782, 2001.
- [29] M. Sajfrtova, H. Sovova, J. Karban, K. Rochova, R. Pavela, and M. Barnet, "Effect of separation method on chemical composition and insecticidal activity of Lamiaceae isolates," *Ind. Crops Prod.*, vol. 47, pp. 69–77, 2013.
- [30] N. Gelmez, N. S. Kincal, and M. E. Yener, "Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 48, no. 3, pp. 217–224, 2009.
- [31] S. Machmudah, M. Kondo, M. Sasaki, M. Goto, J. Munemasa, and M. Yamagata, "Pressure effect in supercritical CO₂ extraction of plant seeds," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 44, no. 3, pp. 301–307, 2008.
- [32] J. R. Bowyer and J. D. Pleil, "Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction of organic compounds from carpet samples," *J. Chromatogr. A*, vol. 787, no. 1–2, pp. 171–179, 1997.
- [33] P. T. W. Barroso, P. P. de Carvalho, T. B. Rocha, F. L. P. Pessoa, D. A. Azevedo, and M. F. Mendes, "Evaluation of the composition of *Carica papaya* L. seed oil extracted with supercritical CO₂," *Biotechnol. Reports*, vol. 11, pp. 110–116, 2016.
- [34] U. Hintermair *et al.*, "A versatile lab to pilot scale continuous reaction system for supercritical fluid processing," *Org. Process Res. Dev.*, vol. 15, no. 6, pp. 1275–

- 1280, 2011.
- [35] N. Babovic *et al.*, "Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 11, no. 1, pp. 98–107, 2010.
- [36] K. Héberger, Á. Keszler, and M. Gude, "Principal component analysis of measured quantities during degradation of hydroperoxides in oxidized vegetable oils," *Lipids*, vol. 34, no. 1, pp. 83–92, 1999.
- [37] Q. Chen, Z. Guo, J. Zhao, and Q. Ouyang, "Comparisons of different regressions tools in measurement of antioxidant activity in green tea using near infrared spectroscopy," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 60, pp. 92–97, 2012.
- [38] N. Sinelli, M. S. Cosio, C. Gigliotti, and E. Casiraghi, "Preliminary study on application of mid infrared spectroscopy for the evaluation of the virgin olive oil 'freshness,'" *Anal. Chim. Acta*, vol. 598, no. 1, pp. 128–134, 2007.
- [39] D. R. V. Carreño, "El orégano de monte (*Lippia origanoides*) del Alto Patía: Efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos," p. 105, 2012.
- [40] "Guayaba - Propiedades de la guayaba." [Online]. Available: <http://alimentos.org.es/guayaba>. [Accessed: 23-May-2017].
- [41] G. M. Lobo Rodrigo, "Caracterización bioquímica de frutos de papaya (*Carica papaya* , cv . Sunrise), hembra y hermafrodita, en relación con su aptitud al procesado por congelación.," Universidad Complutense de Madrid, 1995.
- [42] R. Alvarez, "Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas, estudio de su impacto mediante aproximación metabolómica y evaluación de la calidad poscosecha," Univeridad de antioqía, Colombia, 2012.
- [43] J. O. Orduz-rodríguez, J. Monroy, S. Barrera, V. Núñez, and G. Ligarreto, "Caracterización morfo-agronómica y molecular de mandarina ' Arrayana ' en el piedemonte del Meta (Colombia)," *Rev. Corpoica - Cienc. y Tecnol. Agropecu.*, vol. 13, no. 1, pp. 5–12, 2012.
- [44] A. M. Rincón, A. M. Vásquez, and F. C. Padilla, "Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela.," *Arch. Latinoam. Nutr.*, vol. 55, no. 3, pp. 305–310, 2005.
- [45] E. Contreras and J. Ruiz, "Estudio comparativo de dos métodos de extracción para

- el aceite esencial presente en la cáscara de pomelo (*Citrus maxima*),” Universidad de Cartagena, Colombia, 2012.
- [46] A. Romero and S. Hernandez, *Alimentica*, vol. 6, no. 6. Bogotá, Colombia: Universidad Jorge Tadeo Lozano, 2007.
- [47] C. Navarrete, J. Gil, D. Durango, and C. Garcia, “Extracción y caracterización del aceite esencial de manadaria obtenido de residuos agroindustriales,” *Dyna*, vol. 162, no. 1, pp. 85–92, 2009.
- [48] A. E. Irondi, K. K. Anokam, and U. S. Ndidi, “Effect of drying methods on the phytochemicals composition and antioxidant activities of *Carica papaya* seed,” *Int. J. Biosci.*, vol. 3, no. 11, pp. 154–163, 2013.
- [49] S. Caverio *et al.*, “Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano. Chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 38, no. 1, pp. 62–69, 2006.
- [50] H. I. Castro-vargas, “Obtención de antioxidantes a partir de residuos frutícolas empleando extracción con fluidos supercríticos-EFS,” Universidad Nacional de Colombia, 2013.
- [51] A. Maisarah, B. Nurul Amira, R. Asmah, and O. Fauziah, “Antioxidant analysis of different parts of *Carica papaya*,” *Int. Food Res. J.*, vol. 20, no. 3, pp. 1043–1048, 2013.
- [52] L. Ram, D. Kumar, and S. Kumar, “Supercritical Extraction of Aroma / Flavor and Essential Oil from Nagpur mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) Peel By,” *J. Biol. Chem. Res.*, vol. 30, no. 522, 2013.
- [53] L. Y. Ng, Y. K. Ang, H. E. Khoo, and H. S. Yim, “Influence of Different Extraction Parameters on Antioxidant Properties of *Carica Papaya* Peel and Seed.Pdf,” *Research Journal of Phytochemistry*, vol. 6, no. 3. pp. 61–74, 2012.
- [54] Jorge A. Mazarriegos Monterroso, “Identificación y cuantificación de los componentes principales del aceite esencial del flavedo (cáscara) de *Citrus reshni* (Mandarina Cleopatra), *Citrus reticulata* (Mandarina común) y *Citrus reticulata* Blanco o *Citrus tangerina* (Mandarina Dancy) por medio ,” Universidad de San Carlos, Guatemala, 2008.
- [55] K. Zhou, H. Wang, W. Mei, X. Li, Y. Luo, and H. Dai, “Antioxidant activity of papaya seed extracts,” *Molecules*, vol. 16, no. 8, pp. 6179–6192, 2011.
- [56] E. E. Stashenko and J. R. Martínez, “Algunos aspectos prácticos para la

- identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas,” *Sci. Chromatogr.*, vol. 2, pp. 29–47, 2010.
- [57] F. Harzallah-skhiri, H. Ben Jannet, S. Hammami, and Z. Mighri, “Variation of volatile compounds in two *Prosopis farcta* (Banks et Sol .) Eig . (Fabales , Fabaceae = Leguminosae) populations,” *Flavour Fragr. J.*, pp. 484–487, 2006.
- [58] M. Jalali-heravi, B. Zekavat, and H. Sereshti, “Characterization of essential oil components of Iranian geranium oil using gas chromatography – mass spectrometry combined with chemometric resolution techniques,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1114, pp. 154–163, 2006.
- [59] C. A. ndres Coy Barrera, “Caracterización y variabilidad química de dos aceites esenciales de *Croton funcianus* (Euphorbiaceae),” *Rev. Cienc. en Desarro.*, vol. 6, no. 2, pp. 155–160, 2015.
- [60] M. Hazzit, A. Baaliouamer, A. R. Veríssimo, M. L. Faleiro, and M. G. Miguel, “Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils,” *Food Chem.*, vol. 116, no. 3, pp. 714–721, 2009.
- [61] H. I. Castro-vargas, “Extracción de fenoles a partir de semillas de guayaba (*Psidium guajava* L.) empleando fluidos presurizados,” Universidad Nacional de Colombia, 2008.